



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115667539 A

(43) 申请公布日 2023. 01. 31

(21) 申请号 202180036193.4

(22) 申请日 2021.06.25

(30) 优先权数据

2020-109576 2020.06.25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/024075 2021.06.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/261577 JA 2021.12.30

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 西村香绪梨 谷口贵昭

筱原正次郎 笼谷万奈

美细津美树

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

专利代理师 张国梁 张莹

(51) Int.Cl.

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书144页

序列表66页 附图29页

(54) 发明名称

具有改变的遗传密码表的翻译系统

(57) 摘要

通过使用在特定密码子框中、用连接酶连接 pCpA-氨基酸和3' 末端的CA缺损tRNA而制备的氨酰化tRNA,成功区别读出由于摆动碱基对的存在而难读的NNA和NNG密码子。进一步,向相同密码子框的NNU或NNC密码子分配其它氨基酸,翻译包含NNU、NNA和NNG或者NNC、NNA和NNG的3个密码子的序列而评价密码子的区别读出能力,发现从目的密码子仅特异性翻译与其对应的氨基酸,成功进行正确区别读出。此外,确认了即使变更tRNA体的序列也能得到同样的效果。

1. 翻译系统,其包含具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,

其中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与所述2种tRNA结合。

2. 权利要求1中所述的翻译系统,其中,从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框,能够翻译至少2种氨基酸或氨基酸类似物。

3. 翻译系统,其包含:

(i) 具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,或

(ii) 具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子,

其中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与所述(i)和(ii)中的3种tRNA结合。

4. 权利要求1或3中所述的翻译系统,其中,从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框,能够翻译至少3种氨基酸或氨基酸类似物。

5. 权利要求1至4的任一项中所述的翻译系统,其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(x)的任一种:

- (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),
- (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是腺苷(A),
- (iii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),
- (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),
- (v) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),
- (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是尿苷(U),
- (vii) M_1 是腺苷(A), M_2 是胞苷(C),
- (viii) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),
- (ix) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G),或
- (x) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。

6. 权利要求5中所述的翻译系统,其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(vii)的任一种:

- (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),
- (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),
- (iii) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),
- (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),
- (v) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),
- (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G),或
- (vii) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。

7. 权利要求1至6的任一项中所述的翻译系统,其中,所述翻译系统中包含的所述tRNA的每一密码子的浓度是(i) $0.8 \sim 1000 \mu\text{M}$ 、(ii) $1.6 \sim 500 \mu\text{M}$ 、(iii) $3.2 \sim 250 \mu\text{M}$ 、(iv) $6.4 \sim$

150 μ M、或(v) 10~100 μ M的任一种。

8. 权利要求1至7的任一项中所述的翻译系统,其中,所述氨基酸是天然氨基酸或非天然氨基酸。

9. 权利要求1至8的任一项中所述的翻译系统,其中,所述tRNA是起始tRNA或延伸tRNA。

10. 权利要求1至9的任一项中所述的翻译系统,其中,所述tRNA是来自原核生物或来自真核生物的tRNA。

11. 权利要求1至10的任一项中所述的翻译系统,其中,所述反密码子包含腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、或尿苷(U)的任1种或多种的核苷。

12. 权利要求1至11的任一项中所述的翻译系统,其中,从一个遗传密码表,能够翻译多于20种的氨基酸或氨基酸类似物。

13. 权利要求1至12的任一项中所述的翻译系统,其为无细胞翻译系统。

14. 权利要求13中所述的翻译系统,其为重构型的无细胞翻译系统。

15. 权利要求13或14中所述的翻译系统,其包含来自大肠杆菌的核糖体。

16. 权利要求1至15的任一项中所述的翻译系统,其中,所述tRNA与翻译系统外的所述氨基酸或氨基酸类似物结合。

17. 权利要求1至16的任一项中所述的翻译系统,其中,所述tRNA中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与翻译系统外的所述氨基酸或氨基酸类似物结合。

18. 权利要求1至17的任一项中所述的翻译系统,其中,所述tRNA通过pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法得到。

19. 权利要求1至18的任一项中所述的翻译系统的制备方法,其包括使所述氨基酸或氨基酸类似物在翻译系统外与tRNA结合。

20. 权利要求19中所述的翻译系统的制备方法,其中,所述翻译系统外的氨基酸或氨基酸类似物与tRNA的结合通过pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法进行。

21. 肽的制备方法,其包括应用权利要求1至18的任一项中所述的翻译系统或通过权利要求19或20中所述的方法得到的翻译系统翻译核酸。

22. 权利要求21中所述的方法,其中,肽是具有环状部分的肽。

23. 肽,其通过权利要求21或22中所述的方法制备。

24. 肽文库的制备方法,其包括应用权利要求1至18的任一项中所述的翻译系统或通过权利要求19或20中所述的方法得到的翻译系统翻译核酸文库。

25. 肽文库,其通过权利要求24中所述的方法制备。

26. 对靶标分子具有结合活性的肽的鉴定方法,其包括使所述靶标分子与权利要求25中所述的肽文库接触。

具有改变的遗传密码表的翻译系统

技术领域

[0001] 本公开涉及具有改变的遗传密码的翻译系统及其使用方法。

背景技术

[0002] 展示文库是可以进化工程上有效取得与靶标蛋白结合的分子的非常有用的技术。为了应用展示文库取得对任意靶标分子显示高结合能力的分子、或取得与多个表位分别结合的多种分子,需要从具有高多样性的文库淘选。为了构建多样性高的文库,考虑增加其构成单位(构建块)的数目、或增加种类,但在从膜透过性的观点看来分子量有限的情形中,构建块的数目也受限。因此,为了提高文库的多样性增加构建块的种类的手段具有重要意义。

[0003] 由于如PURESYSTEM(非专利文献1)的重构的无细胞翻译系统可以调整氨基酸、tRNA、氨酰tRNA合成酶(aminoacyl-tRNA synthetase;ARS)等构成成分的浓度,可以改变天然的密码子-氨基酸的对应性。通过应用这样的翻译系统,可以构建导入了20种以上的任意构建块的展示文库,但在应用3碱基密码子的大肠杆菌的翻译系统中,由于存在摆动(wobble)规则,原理上考虑可以导入的构建块的上限是32种。更具体说明时,在密码子的第3个字母和反密码子的第1个字母的配对中,存在“游动”,除了沃森-克里克(Watson-Crick)碱基对以外,称为摆动碱基对的G·U间的配对也是可能的。因此,由于反密码子GNN解码(decode)NNU和NNC的密码子,反密码子UNN解码NNA和NNG的密码子,无法区别读出这些密码子,可以导入1个密码子框的氨基酸的种类限制为最多2种氨基酸(非专利文献2)。

[0004] 迄今,报告了在特定的密码子框中,对NNA和NNG的密码子分配不同的氨基酸(非专利文献3、非专利文献4、专利文献1),但不存在进一步在相同的密码子框中分配另一其它氨基酸、同时并且正确地读出总共3个氨基酸、成功扩展构建块的数目的报告。进一步,在已报告的方法中,认为能够选择的氨基酸的通用性低。此外,在翻译中使用系统外配制的氨酰tRNA的情形中,需要比通过系统内ARS配制的氨酰化tRNA的浓度更高浓度的氨酰tRNA,该情形中也数学显示NNA和NNG密码子的区别读出变难(非专利文献5)。

[0005] 在本技术领域,将各种氨基酸适用于密码子表、和将各密码子正确区别读出进行翻译确定展示文库的质量。对各密码子分配的氨基酸从各自的密码子特异性翻译是非常重要的。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:W02016/154675

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:Shimizu et al.,Nat Biotechnol.2001;19(8):751-755.

[0011] 非专利文献2:Iwane et al.,Nat Chem.2016;8(4):317-325.

[0012] 非专利文献3:Mukai et al.,Nucleic Acids Res.2015;43(16):8111-8122.

[0013] 非专利文献4:Cui et al.,J Am Chem Soc.2015;137(13):4404-4413.

[0014] 非专利文献5:Frenkel-Morgenstern et al.,Mol Syst Biol.2012;8:572.

[0015] 发明概述

[0016] 发明要解决的课题

[0017] 迄今也以密码子扩展为目的进行了各种尝试,但不存在明确显示对NNA和NNG的密码子分配不同的氨基酸、正确地区别读出它们的报告。此外,也不存在明确显示在相同的密码子框内分配3个氨基酸、正确地区别读出它们的报告。本发明鉴于这样的状况作出,其目的之一是提供可以进行密码子的区别读出的新手段。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 此次,本发明人在特定的密码子框中因摆动碱基对的存在而难读的NNA和NNG密码子的区别读出方面获得成功。进一步,对相同密码子框的NNU或NNC密码子分配其它氨基酸。实际翻译包含这3个密码子的序列、评价区别读出能力时,成功地从目的密码子特异性翻译仅与其对应的氨基酸、正确的区别读出也被数值确认。

[0020] 本公开基于这样的知识,具体地,包含以下(1)~(32)中示例性记载的实施方式。

[0021] (1)

[0022] 翻译系统,其包含:具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,

[0023] M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

[0024] 相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与前述2种tRNA结合。

[0025] (2)

[0026] (1)中记载的翻译系统,其中,可以从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框翻译至少2种氨基酸或氨基酸类似物。

[0027] (3)

[0028] 翻译系统,其包含:

[0029] (i) 具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、或

[0030] (ii) 具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子,

[0031] M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

[0032] 相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与前述(i)和(ii)中的3种tRNA结合。

[0033] (4)

[0034] (1)至(3)的任一项中记载的翻译系统,其中,可以从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框翻译至少3种氨基酸或氨基酸类似物。

[0035] (5)

[0036] (1)至(4)的任一项中记载的翻译系统,其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(X)的任一种:

[0037] (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),

[0038] (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是腺苷(A),

[0039] (iii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),

[0040] (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),

- [0041] (v) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),
- [0042] (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是尿苷(U),
- [0043] (vii) M_1 是腺苷(A), M_2 是胞苷(C),
- [0044] (viii) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),
- [0045] (ix) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G), 或
- [0046] (x) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。
- [0047] (6)
- [0048] (5)中记载的翻译系统, 其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(vii)的任一种:
- [0049] (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),
- [0050] (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),
- [0051] (iii) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),
- [0052] (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),
- [0053] (v) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),
- [0054] (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G), 或
- [0055] (vii) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。
- [0056] (7)
- [0057] (1)至(6)的任一项中记载的翻译系统, 其中, 前述翻译系统中包含的前述tRNA的每一密码子的浓度是(i) $0.8 \sim 1000 \mu\text{M}$ 、(ii) $1.6 \sim 500 \mu\text{M}$ 、(iii) $3.2 \sim 250 \mu\text{M}$ 、(iv) $6.4 \sim 150 \mu\text{M}$ 、或(v) $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 的任一种。
- [0058] (8)
- [0059] (1)至(7)的任一项中记载的翻译系统, 其中, 前述氨基酸是天然氨基酸或非天然氨基酸。
- [0060] (9)
- [0061] (1)至(8)的任一项中记载的翻译系统, 其中, 前述tRNA是起始tRNA或延伸tRNA。
- [0062] (10)
- [0063] (1)至(9)的任一项中记载的翻译系统, 其中, 前述tRNA是来自原核生物或来自真核生物的tRNA。
- [0064] (11)
- [0065] (1)至(10)的任一项中记载的翻译系统, 其中, 前述反密码子包含腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、或尿苷(U)的任1种或多种的核苷。
- [0066] (12)
- [0067] (1)至(11)的任一项中记载的翻译系统, 其中, 可以从一个遗传密码表翻译多于20种的氨基酸或氨基酸类似物。
- [0068] (13)
- [0069] (1)至(12)的任一项中记载的翻译系统, 其为无细胞翻译系统。
- [0070] (14)
- [0071] (13)中记载的翻译系统, 其为重构型的无细胞翻译系统。
- [0072] (15)
- [0073] (13)或(14)中记载的翻译系统, 其包含来自大肠杆菌的核糖体。

[0074] (16)

[0075] (1)至(15)的任一项中记载的翻译系统,其中,前述tRNA与翻译系统外的前述氨基酸或氨基酸类似物结合。

[0076] (17)

[0077] (1)至(16)的任一项中记载的翻译系统,其中,前述tRNA中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与翻译系统外的前述氨基酸或氨基酸类似物结合。

[0078] (18)

[0079] (1)至(17)的任一项中记载的翻译系统,其中,前述tRNA通过pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法得到。

[0080] (19)

[0081] (1)至(18)的任一项中记载的翻译系统的制备方法,其包括使前述氨基酸或氨基酸类似物在翻译系统外与tRNA结合。

[0082] (20)

[0083] (19)中记载的方法,其中,前述翻译系统外的氨基酸或氨基酸类似物与tRNA的结合通过pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法进行。

[0084] (21)

[0085] 肽的制备方法,其包括应用(1)至(18)的任一项中记载的翻译系统或通过(19)或(20)中记载的方法得到的翻译系统翻译核酸。

[0086] (22)

[0087] (21)中记载的方法,其中,肽是具有环状部分的肽。

[0088] (23)

[0089] 肽,其通过(21)或(22)中记载的方法制备。

[0090] (24)

[0091] 肽文库的制备方法,其包括应用(1)至(18)的任一项中记载的翻译系统或通过(19)或(20)中记载的方法得到的翻译系统翻译核酸文库。

[0092] (25)

[0093] 肽文库,其通过(24)中记载的方法制备。

[0094] (26)

[0095] 对靶标分子具有结合活性的肽的鉴定方法,其包括使该靶标分子与(25)中记载的肽文库接触。

[0096] (27)

[0097] (1)至(18)的任一项中记载的翻译系统,其中,前述反密码子不含赖胞苷。

[0098] (28)

[0099] (1)至(18)和(27)的任一项中记载的翻译系统,其中,前述反密码子不含赖胞苷衍生物。

[0100] (29)

[0101] (1)至(18)、(27)和(28)的任一项中记载的翻译系统,其中,前述反密码子不含胍

丁胺胞苷。

[0102] (30)

[0103] (1)至(18)和(27)至(29)的任一项中记载的翻译系统,其中,前述反密码子不含胍丁胺胞苷衍生物。

[0104] (31)

[0105] (1)至(18)和(27)至(30)的任一项中记载的翻译系统,其进一步包含含有由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子的核酸。

[0106] (32)

[0107] (31)中记载的翻译系统,其中,前述核酸包含:(i)由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子,或(ii)由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子。

[0108] 此外,本公开包含以下(101)~(120)中示例性记载的实施方式。

[0109] (101)

[0110] 肽的制备方法,其包括应用翻译系统翻译核酸,

[0111] 前述翻译系统包含具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,

[0112] M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

[0113] 相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与前述2种tRNA结合。

[0114] (102)

[0115] (101)中记载的方法,其中,可以从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框翻译至少2种氨基酸或氨基酸类似物。

[0116] (103)

[0117] 肽的制备方法,其包括应用翻译系统翻译核酸,

[0118] 前述翻译系统包含:

[0119] (i)具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、或

[0120] (ii)具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,

[0121] M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

[0122] 相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与前述(i)和(ii)中的3种tRNA结合。

[0123] (104)

[0124] (101)至(103)的任一项中记载的方法,其中,可以从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框翻译至少3种氨基酸或氨基酸类似物。

[0125] (105)

[0126] (101)至(104)的任一项中记载的方法,其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(x)的任一种:

[0127] (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),

[0128] (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是腺苷(A),

- [0129] (iii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),
- [0130] (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),
- [0131] (v) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),
- [0132] (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是尿苷(U),
- [0133] (vii) M_1 是腺苷(A), M_2 是胞苷(C),
- [0134] (viii) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),
- [0135] (ix) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G), 或 (x) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。
- [0136] (106)
- [0137] (105)中记载的方法, 其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(vii)的任一种:
- [0138] (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),
- [0139] (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),
- [0140] (iii) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),
- [0141] (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),
- [0142] (v) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),
- [0143] (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G), 或
- [0144] (vii) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。
- [0145] (107)
- [0146] (101)至(106)的任一项中记载的方法, 其中, 前述翻译系统中包含的前述tRNA的每一密码子的浓度是(i) $0.8 \sim 1000 \mu\text{M}$ 、(ii) $1.6 \sim 500 \mu\text{M}$ 、(iii) $3.2 \sim 250 \mu\text{M}$ 、(iv) $6.4 \sim 150 \mu\text{M}$ 、或(v) $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 的任一种。
- [0147] (108)
- [0148] (101)至(107)的任一项中记载的方法, 其中, 前述氨基酸是天然氨基酸或非天然氨基酸。
- [0149] (109)
- [0150] (101)至(108)的任一项中记载的方法, 其中, 前述tRNA是起始tRNA或延伸tRNA。
- [0151] (110)
- [0152] (101)至(109)的任一项中记载的方法, 其中, 前述tRNA是来自原核生物或来自真核生物的tRNA。
- [0153] (111)
- [0154] (101)至(110)的任一项中记载的方法, 其中, 前述反密码子包含腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、或尿苷(U)的任1种或多种核苷。
- [0155] (112)
- [0156] (101)至(111)的任一项中记载的方法, 其中, 可以从一个遗传密码表翻译多于20种的氨基酸。
- [0157] (113)
- [0158] (101)至(112)的任一项中记载的方法, 其中, 翻译系统是无细胞翻译系统。
- [0159] (114)
- [0160] (113)中记载的方法, 其中, 翻译系统是重构型的无细胞翻译系统。
- [0161] (115)

[0162] (113)或(114)中记载的方法,其中,翻译系统包含来自大肠杆菌的核糖体。

[0163] (116)

[0164] (101)至(115)的任一项中记载的方法,其中,前述tRNA与翻译系统外的前述氨基酸或氨基酸类似物结合。

[0165] (117)

[0166] (101)至(116)的任一项中记载的方法,其中,前述tRNA中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与翻译系统外的前述氨基酸或氨基酸类似物结合。

[0167] (118)

[0168] (101)至(117)的任一项中记载的方法,其中,前述tRNA通过pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法得到。

[0169] (119)

[0170] (101)至(118)的任一项中记载的方法,其中,前述核酸包含由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子。

[0171] (120)

[0172] (103)至(118)的任一项中记载的方法,其中,前述核酸包含:(i)由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子,或(ii)由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子。

[0173] 此外,本公开包含以下(201)~(218)中示例性记载的实施方式。

[0174] (201)

[0175] 用于制备肽的试剂盒或组合物,

[0176] 其包含具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,

[0177] M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

[0178] 相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与前述2种tRNA结合。

[0179] (202)

[0180] (201)中记载的方法,其中,可以从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框翻译至少2种氨基酸或氨基酸类似物。

[0181] (203)

[0182] 用于制备肽的试剂盒或组合物,其包含:

[0183] (i)具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,或

[0184] (ii)具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子,

[0185] M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷、 M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种,

[0186] 相互不同的氨基酸或氨基酸类似物分别与前述(i)和(ii)中的3种tRNA结合。

[0187] (204)

[0188] (201)至(203)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,可以从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框翻译至少3种氨基酸或氨基酸类似物。

[0189] (205)

[0190] (201)至(204)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(x)的任一种:

[0191] (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),

[0192] (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是腺苷(A),

[0193] (iii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),

[0194] (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),

[0195] (v) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),

[0196] (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是尿苷(U),

[0197] (vii) M_1 是腺苷(A), M_2 是胞苷(C),

[0198] (viii) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),

[0199] (ix) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G),或

[0200] (x) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。

[0201] (206)

[0202] (205)中记载的试剂盒或组合物,其中, M_1 和 M_2 是以下的(i)至(vii)的任一种:

[0203] (i) M_1 是尿苷(U), M_2 是尿苷(U),

[0204] (ii) M_1 是尿苷(U), M_2 是鸟苷(G),

[0205] (iii) M_1 是胞苷(C), M_2 是腺苷(A),

[0206] (iv) M_1 是胞苷(C), M_2 是鸟苷(G),

[0207] (v) M_1 是腺苷(A), M_2 是腺苷(A),

[0208] (vi) M_1 是腺苷(A), M_2 是鸟苷(G),或

[0209] (vii) M_1 是鸟苷(G), M_2 是腺苷(A)。

[0210] (207)

[0211] (201)至(206)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述tRNA的每一密码子的浓度是(i) $0.8\sim 1000\mu\text{M}$ 、(ii) $1.6\sim 500\mu\text{M}$ 、(iii) $3.2\sim 250\mu\text{M}$ 、(iv) $6.4\sim 150\mu\text{M}$ 、或(v) $10\sim 100\mu\text{M}$ 的任一种。

[0212] (208)

[0213] (201)至(207)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述氨基酸是天然氨基酸或非天然氨基酸。

[0214] (209)

[0215] (201)至(208)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述tRNA是起始tRNA或延伸tRNA。

[0216] (210)

[0217] (201)至(209)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述tRNA是来自原核生物或来自真核生物的tRNA。

[0218] (211)

[0219] (201)至(210)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述反密码子包含腺苷

(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、或尿苷(U)的任1种或多种的核苷。

[0220] (212)

[0221] (201)至(211)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,可以从一个遗传密码表翻译多于20种的氨基酸。

[0222] (213)

[0223] (201)至(212)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,翻译系统是无细胞翻译系统。

[0224] (214)

[0225] (213)中记载的试剂盒或组合物,其中,翻译系统是重构型的无细胞翻译系统。

[0226] (215)

[0227] (213)或(214)中记载的试剂盒或组合物,其中,翻译系统包含来自大肠杆菌的核糖体。

[0228] (216)

[0229] (201)至(215)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述tRNA与翻译系统外的前述氨基酸或氨基酸类似物结合。

[0230] (217)

[0231] (201)至(216)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述tRNA中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与翻译系统外的前述氨基酸或氨基酸类似物结合。

[0232] (218)

[0233] (201)至(217)的任一项中记载的试剂盒或组合物,其中,前述tRNA通过pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法得到。

[0234] 附图简述

[0235] [图1]图1是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CUU, CUA, CUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表6)。

[0236] tRNA:化合物AAtR-1(反密码子:aag、氨基酸:nBuG)

[0237] 化合物AAtR-2(反密码子:uag、氨基酸:Pic2)

[0238] 化合物AAtR-3(反密码子:cag、氨基酸:dA)

[0239] mRNA:mR-1(包含CUU的密码子)

[0240] mR-2(包含CUA的密码子)

[0241] mR-3(包含CUG的密码子)

[0242] [图2]图2是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是GUU, GUA, GUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表7)。

[0243] tRNA:化合物AAtR-4(反密码子:aac、氨基酸:nBuG)

[0244] 化合物AAtR-5(反密码子:uac、氨基酸:Pic2)

[0245] 化合物AAtR-6(反密码子:cac、氨基酸:dA)

[0246] mRNA:mR-4 (包含GUU的密码子)

[0247] mR-5 (包含GUA的密码子)

[0248] mR-6 (包含GUG的密码子)

[0249] [图3]图3是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAU,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表8)。

[0250] tRNA:化合物AAtR-7 (反密码子:aug、氨基酸:nBuG)

[0251] 化合物AAtR-8 (反密码子:uug、氨基酸:Pic2)

[0252] 化合物AAtR-9 (反密码子:cug、氨基酸:dA)

[0253] mRNA:mR-7 (包含CAU的密码子)

[0254] mR-8 (包含CAA的密码子)

[0255] mR-9 (包含CAG的密码子)

[0256] [图4]图4是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AAU,AAA,AAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表9)。

[0257] tRNA:化合物AAtR-10 (反密码子:auu、氨基酸:nBuG)

[0258] 化合物AAtR-11 (反密码子:uuu、氨基酸:Pic2)

[0259] 化合物AAtR-12 (反密码子:cuu、氨基酸:dA)

[0260] mRNA:mR-10 (包含AAU的密码子)

[0261] mR-11 (包含AAA的密码子)

[0262] mR-12 (包含AAG的密码子)

[0263] [图5]图5是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是GAU,GAA,GAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表10)。

[0264] tRNA:化合物AAtR-13 (反密码子:auc、氨基酸:nBuG)

[0265] 化合物AAtR-14 (反密码子:uuc、氨基酸:Pic2)

[0266] 化合物AAtR-15 (反密码子:cuc、氨基酸:dA)

[0267] mRNA:mR-13 (包含GAU的密码子)

[0268] mR-14 (包含GAA的密码子)

[0269] mR-15 (包含GAG的密码子)

[0270] [图6]图6是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是UUU,UUA,UUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表11)。

[0271] tRNA:化合物AAtR-16 (反密码子:aaa、氨基酸:nBuG)

[0272] 化合物AAtR-17 (反密码子:uua、氨基酸:Pic2)

[0273] 化合物AAtR-18 (反密码子:caa、氨基酸:dA)

[0274] mRNA:mR-16 (包含UUU的密码子)

[0275] mR-17 (包含UUA的密码子)

[0276] mR-18 (包含UUG的密码子)

[0277] [图7]图7是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AGU,AGA,AGG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表12)。

[0278] tRNA:化合物AAtR-19(反密码子:acu、氨基酸:nBuG)

[0279] 化合物AAtR-20(反密码子:ucu、氨基酸:Pic2)

[0280] 化合物AAtR-21(反密码子:ccu、氨基酸:dA)

[0281] mRNA:mR-19(包含AGU的密码子)

[0282] mR-20(包含AGA的密码子)

[0283] mR-21(包含AGG的密码子)

[0284] [图8]图8是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是UGC,UGA,UGG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表13)。

[0285] tRNA:化合物AAtR-22(反密码子:gca、氨基酸:nBuG)

[0286] 化合物AAtR-23(反密码子:uca、氨基酸:Pic2)

[0287] 化合物AAtR-24(反密码子:cca、氨基酸:dA)

[0288] mRNA:mR-22(包含UGC的密码子)

[0289] mR-23(包含UGA的密码子)

[0290] mR-24(包含UGG的密码子)

[0291] [图9]图9是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAC,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表14)。

[0292] tRNA:化合物AAtR-26(反密码子:gug、氨基酸:nBuG)

[0293] 化合物AAtR-8(反密码子:uug、氨基酸:Pic2)

[0294] 化合物AAtR-9(反密码子:cug、氨基酸:dA)

[0295] mRNA:mR-25(包含CAC的密码子)

[0296] mR-8(包含CAA的密码子)

[0297] mR-9(包含CAG的密码子)

[0298] [图10]图10是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AAC,AAA,AAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表15)。

[0299] tRNA:化合物AAtR-27(反密码子:guu、氨基酸:nBuG)

[0300] 化合物AAtR-11(反密码子:uuu、氨基酸:Pic2)

[0301] 化合物AAtR-12(反密码子:cuu、氨基酸:dA)

[0302] mRNA:mR-26(包含AAC的密码子)

[0303] mR-11(包含AAA的密码子)

[0304] mR-12(包含AAG的密码子)

[0305] [图11]图11是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AGC,AGA,AGG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表16)。

- [0306] tRNA:化合物AA_tR-28(反密码子:gcu、氨基酸:nBuG)
- [0307] 化合物AA_tR-20(反密码子:ucu、氨基酸:Pic₂)
- [0308] 化合物AA_tR-21(反密码子:ccu、氨基酸:dA)
- [0309] mRNA:mR-29(包含AGC的密码子)
- [0310] mR-20(包含AGA的密码子)
- [0311] mR-21(包含AGG的密码子)
- [0312] [图12]图12是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAU,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表17)。
- [0313] tRNA:化合物AA_tR-29(反密码子:aug、氨基酸:MeA₃Pyr)
- [0314] 化合物AA_tR-30(反密码子:uug、氨基酸:StBuOH)
- [0315] 化合物AA_tR-31(反密码子:cug、氨基酸:MeSnPr)
- [0316] mRNA:mR-7(包含CAU的密码子)
- [0317] mR-8(包含CAA的密码子)
- [0318] mR-9(包含CAG的密码子)
- [0319] [图13]图13是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AAU,AAA,AAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表18)。
- [0320] tRNA:化合物AA_tR-32(反密码子:auu、氨基酸:MeA₃Pyr)
- [0321] 化合物AA_tR-33(反密码子:uuu、氨基酸:StBuOH)
- [0322] 化合物AA_tR-34(反密码子:cuu、氨基酸:MeSnPr)
- [0323] mRNA:mR-10(包含AAU的密码子)
- [0324] mR-11(包含AAA的密码子)
- [0325] mR-12(包含AAG的密码子)
- [0326] [图14]图14是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是GAU,GAA,GAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表19)。
- [0327] tRNA:化合物AA_tR-35(反密码子:auc、氨基酸:MeA₃Pyr)
- [0328] 化合物AA_tR-36(反密码子:uuc、氨基酸:StBuOH)
- [0329] 化合物AA_tR-37(反密码子:cuc、氨基酸:MeSnPr)
- [0330] mRNA:mR-13(包含GAU的密码子)
- [0331] mR-14(包含GAA的密码子)
- [0332] mR-15(包含GAG的密码子)
- [0333] [图15]图15是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是UUU,UUA,UUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表20)。
- [0334] tRNA:化合物AA_tR-38(反密码子:aaa、氨基酸:MeA₃Pyr)
- [0335] 化合物AA_tR-39(反密码子:uua、氨基酸:StBuOH)
- [0336] 化合物AA_tR-40(反密码子:caa、氨基酸:MeSnPr)

- [0337] mRNA:mR-16 (包含UUU的密码子)
- [0338] mR-17 (包含UUA的密码子)
- [0339] mR-18 (包含UUG的密码子)
- [0340] [图16]图16是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AGU,AGA,AGG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表21)。
- [0341] tRNA:化合物AAtR-41 (反密码子:acu、氨基酸:MeA3Pyr)
- [0342] 化合物AAtR-42 (反密码子:ucu、氨基酸:StBuOH)
- [0343] 化合物AAtR-43 (反密码子:ccu、氨基酸:MeSnPr)
- [0344] mRNA:mR-19 (包含AGU的密码子)
- [0345] mR-20 (包含AGA的密码子)
- [0346] mR-21 (包含AGG的密码子)
- [0347] [图17]图17是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是UGC,UGA,UGG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表22)。
- [0348] tRNA:化合物AAtR-44 (反密码子:gca、氨基酸:MeA3Pyr)
- [0349] 化合物AAtR-45 (反密码子:uca、氨基酸:StBuOH)
- [0350] 化合物AAtR-46 (反密码子:cca、氨基酸:MeSnPr)
- [0351] mRNA:mR-22 (包含UGC的密码子)
- [0352] mR-23 (包含UGA的密码子)
- [0353] mR-24 (包含UGG的密码子)
- [0354] [图18]图18是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAC,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表23)。
- [0355] tRNA:化合物AAtR-47 (反密码子:gug、氨基酸:MeA3Pyr)
- [0356] 化合物AAtR-30 (反密码子:uug、氨基酸:StBuOH)
- [0357] 化合物AAtR-31 (反密码子:cug、氨基酸:MeSnPr)
- [0358] mRNA:mR-25 (包含CAC的密码子)
- [0359] mR-8 (包含CAA的密码子)
- [0360] mR-9 (包含CAG的密码子)
- [0361] [图19]图19是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AAC,AAA,AAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表24)。
- [0362] tRNA:化合物AAtR-48 (反密码子:guu、氨基酸:MeA3Pyr)
- [0363] 化合物AAtR-33 (反密码子:uuu、氨基酸:StBuOH)
- [0364] 化合物AAtR-34 (反密码子:cuu、氨基酸:MeSnPr)
- [0365] mRNA:mR-26 (包含AAC的密码子)
- [0366] mR-11 (包含AAA的密码子)
- [0367] mR-12 (包含AAG的密码子)

[0368] [图20]图20是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是GAC,GAA,GAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表25)。

[0369] tRNA:化合物AAtR-49(反密码子:guc、氨基酸:MeA3Pyr)

[0370] 化合物AAtR-36(反密码子:uuc、氨基酸:StBuOH)

[0371] 化合物AAtR-37(反密码子:cuc、氨基酸:MeSnPr)

[0372] mRNA:mR-27(包含GAC的密码子)

[0373] mR-14(包含GAA的密码子)

[0374] mR-15(包含GAG的密码子)

[0375] [图21]图21是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是UUC,UUA,UUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表26)。

[0376] tRNA:化合物AAtR-50(反密码子:gaa、氨基酸:MeA3Pyr)

[0377] 化合物AAtR-39(反密码子:uua、氨基酸:StBuOH)

[0378] 化合物AAtR-40(反密码子:caa、氨基酸:MeSnPr)

[0379] mRNA:mR-28(包含UUC的密码子)

[0380] mR-17(包含UUA的密码子)

[0381] mR-18(包含UUG的密码子)

[0382] [图22]图22是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是AGC,AGA,AGG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表27)。

[0383] tRNA:化合物AAtR-51(反密码子:gcu、氨基酸:MeA3Pyr)

[0384] 化合物AAtR-42(反密码子:ucu、氨基酸:StBuOH)

[0385] 化合物AAtR-43(反密码子:ccu、氨基酸:MeSnPr)

[0386] mRNA:mR-29(包含AGC的密码子)

[0387] mR-20(包含AGA的密码子)

[0388] mR-21(包含AGG的密码子)

[0389] [图23-1]图23-1是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CGC,CGA,CGG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28)。

[0390] tRNA:化合物AAtR-57(反密码子:gcg、氨基酸:nBuG)

[0391] 化合物AAtR-58(反密码子:ucg、氨基酸:SPh2C1)

[0392] 化合物AAtR-59(反密码子:ccg、氨基酸:dA)

[0393] mRNA:mR-42(包含CGU的密码子)

[0394] mR-43(包含CGA的密码子)

[0395] mR-44(包含CGG的密码子)

[0396] [图23-2]图23-2是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAU,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-2)。

- [0397] tRNA:化合物AAtR-60(反密码子:aug、氨基酸:nBuGly)
- [0398] 化合物AAtR-61(反密码子:uug、氨基酸:Pic2)
- [0399] 化合物AAtR-62(反密码子:cug、氨基酸:dA)
- [0400] mRNA:mR-7(包含CAU的密码子)
- [0401] mR-8(包含CAA的密码子)
- [0402] mR-9(包含CAG的密码子)
- [0403] [图23-3]图23-3是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAU,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-3)。
- [0404] tRNA:化合物AAtR-63(反密码子:aug、氨基酸:nBuGly)
- [0405] 化合物AAtR-64(反密码子:uug、氨基酸:Pic2)
- [0406] 化合物AAtR-65(反密码子:cug、氨基酸:dA)
- [0407] mRNA:mR-7(包含CAU的密码子)
- [0408] mR-8(包含CAA的密码子)
- [0409] mR-9(包含CAG的密码子)
- [0410] [图23-4]图23-4是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAC,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-4)。
- [0411] tRNA:化合物AAtR-66(反密码子:gug、氨基酸:nBuGly)
- [0412] 化合物AAtR-67(反密码子:uug、氨基酸:Pic2)
- [0413] 化合物AAtR-68(反密码子:cug、氨基酸:dA)
- [0414] mRNA:mR-25(包含CAC的密码子)
- [0415] mR-8(包含CAA的密码子)
- [0416] mR-9(包含CAG的密码子)
- [0417] [图23-5]图23-5是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAC,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-5)。
- [0418] tRNA:化合物AAtR-69(反密码子:gug、氨基酸:nBuGly)
- [0419] 化合物AAtR-70(反密码子:uug、氨基酸:Pic2)
- [0420] 化合物AAtR-71(反密码子:cug、氨基酸:dA)
- [0421] mRNA:mR-25(包含CAC的密码子)
- [0422] mR-8(包含CAA的密码子)
- [0423] mR-9(包含CAG的密码子)
- [0424] [图23-6]图23-6是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是GAU,GAA,GAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-6)。
- [0425] tRNA:化合物AAtR-72(反密码子:auc、氨基酸:nBuGly)
- [0426] 化合物AAtR-73(反密码子:uuc、氨基酸:Pic2)
- [0427] 化合物AAtR-74(反密码子:cuc、氨基酸:dA)

- [0428] mRNA:mR-13 (包含GAU的密码子)
- [0429] mR-14 (包含GAA的密码子)
- [0430] mR-15 (包含GAG的密码子)
- [0431] [图23-7]图23-7是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAU,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-7)。
- [0432] tRNA:化合物AAtR-75 (反密码子:aug、氨基酸:MeA3Pr)
- [0433] 化合物AAtR-76 (反密码子:uug、氨基酸:StBuOH)
- [0434] 化合物AAtR-77 (反密码子:cug、氨基酸:MeSnPr)
- [0435] mRNA:mR-7 (包含CAU的密码子)
- [0436] mR-8 (包含CAA的密码子)
- [0437] mR-9 (包含CAG的密码子)
- [0438] [图23-8]图23-8是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是CAC,CAA,CAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-8)。
- [0439] tRNA:化合物AAtR-78 (反密码子:gug、氨基酸:MeA3Pr)
- [0440] 化合物AAtR-79 (反密码子:uug、氨基酸:StBuOH)
- [0441] 化合物AAtR-80 (反密码子:cug、氨基酸:MeSnPr)
- [0442] mRNA:mR-25 (包含CAC的密码子)
- [0443] mR-8 (包含CAA的密码子)
- [0444] mR-9 (包含CAG的密码子)
- [0445] [图23-9]图23-9是显示如实施例6~7中记载、1个密码子框中3种氨基酸区别读出的翻译评价的结果的图。评价的密码子是GAU,GAA,GAG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译的情形中得到的肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表28-9)。
- [0446] tRNA:化合物AAtR-81 (反密码子:auc、氨基酸:MeA3Pr)
- [0447] 化合物AAtR-82 (反密码子:uuc、氨基酸:StBuOH)
- [0448] 化合物AAtR-83 (反密码子:cuc、氨基酸:MeSnPr)
- [0449] mRNA:mR-13 (包含GAU的密码子)
- [0450] mR-14 (包含GAA的密码子)
- [0451] mR-15 (包含GAG的密码子)
- [0452] [图24-1]图24-1是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是UCU,UCC,UCA,UCG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的各肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表29-1)。
- [0453] tRNA:化合物AAtR-52 (反密码子:uga、氨基酸:MeHph)
- [0454] tRNA浓度:12.8 μ M
- [0455] 6.4 μ M
- [0456] 3.2 μ M
- [0457] 1.6 μ M

[0458] 0.8 μ M

[0459] mRNA:mR-30 (包含UCU的密码子)

[0460] mR-31 (包含UCC的密码子)

[0461] mR-32 (包含UCA的密码子)

[0462] mR-33 (包含UCG的密码子)

[0463] [图24-2]图24-2是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是UCU,UCC,UCA,UCG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的相对于[各肽的翻译量]的[目的肽的翻译量]的比显示于图的纵轴(具体的测定值参考表29-2)。

[0464] tRNA:化合物AAtR-52 (反密码子:uga、氨基酸:MeHph)

[0465] tRNA浓度:12.8 μ M

[0466] 6.4 μ M

[0467] 3.2 μ M

[0468] 1.6 μ M

[0469] 0.8 μ M

[0470] mRNA:mR-30 (包含UCU的密码子)

[0471] mR-31 (包含UCC的密码子)

[0472] mR-32 (包含UCA的密码子)

[0473] mR-33 (包含UCG的密码子)

[0474] [图25-1]图25-1是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是ACU,ACC,ACA,ACG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的各肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表30-1)。

[0475] tRNA:化合物AAtR-53 (反密码子:ugu、氨基酸:MeHph)

[0476] tRNA浓度:12.8 μ M

[0477] 6.4 μ M

[0478] 3.2 μ M

[0479] 1.6 μ M

[0480] 0.8 μ M

[0481] mRNA:mR-34 (包含ACU的密码子)

[0482] mR-35 (包含ACC的密码子)

[0483] mR-36 (包含ACA的密码子)

[0484] mR-37 (包含ACG的密码子)

[0485] [图25-2]图25-2是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是ACU,ACC,ACA,ACG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的相对于[各肽的翻译量]的[目的肽的翻译量]的比显示于图的纵轴(具体的测定值参考表30-2)。

[0486] tRNA:化合物AAtR-53 (反密码子:ugu、氨基酸:MeHph)

[0487] tRNA浓度:12.8 μ M

[0488] 6.4 μ M

[0489] 3.2 μ M

[0490] 1.6 μ M

[0491] 0.8 μ M

[0492] mRNA:mR-34 (包含ACU的密码子)

[0493] mR-35 (包含ACC的密码子)

[0494] mR-36 (包含ACA的密码子)

[0495] mR-37 (包含ACG的密码子)

[0496] [图26-1]图26-1是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是AUU,AUC,AUA,AUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的各肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表31-1)。

[0497] tRNA:化合物AA_tR-54 (反密码子:uau、氨基酸:MeHph)

[0498] tRNA浓度:12.8 μ M

[0499] 6.4 μ M

[0500] 3.2 μ M

[0501] 1.6 μ M

[0502] 0.8 μ M

[0503] mRNA:mR-38 (包含AUU的密码子)

[0504] mR-39 (包含AUC的密码子)

[0505] mR-40 (包含AUA的密码子)

[0506] mR-41 (包含AUG的密码子)

[0507] [图26-2]图26-2是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是AUU,AUC,AUA,AUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的相对于[各肽的翻译量]的[目的肽的翻译量]的比显示于图的纵轴(具体的测定值参考表31-2)。

[0508] tRNA:化合物AA_tR-54 (反密码子:uau、氨基酸:MeHph)

[0509] tRNA浓度:12.8 μ M

[0510] 6.4 μ M

[0511] 3.2 μ M

[0512] 1.6 μ M

[0513] 0.8 μ M

[0514] mRNA:mR-38 (包含AUU的密码子)

[0515] mR-39 (包含AUC的密码子)

[0516] mR-40 (包含AUA的密码子)

[0517] mR-41 (包含AUG的密码子)

[0518] [图27-1]图27-1是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是AUU,AUC,AUA,AUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的各肽的翻译量显示

于图的纵轴(具体的测定值参考表32-1)。

[0519] tRNA:化合物AA_tR-55(反密码子:uau、氨基酸:MeHph)

[0520] tRNA浓度:12.8μM

[0521] 6.4μM

[0522] 3.2μM

[0523] 1.6μM

[0524] 0.8μM

[0525] mRNA:mR-38(包含AUU的密码子)

[0526] mR-39(包含AUC的密码子)

[0527] mR-40(包含AUA的密码子)

[0528] mR-41(包含AUG的密码子)

[0529] [图27-2]图27-2是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是AUU,AUC,AUA,AUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的相对于[各肽的翻译量]的[目的肽的翻译量]的比显示于图的纵轴(具体的测定值参考表32-2)。

[0530] tRNA:化合物AA_tR-55(反密码子:uau、氨基酸:MeHph)

[0531] tRNA浓度:12.8μM

[0532] 6.4μM

[0533] 3.2μM

[0534] 1.6μM

[0535] 0.8μM

[0536] mRNA:mR-38(包含AUU的密码子)

[0537] mR-39(包含AUC的密码子)

[0538] mR-40(包含AUA的密码子)

[0539] mR-41(包含AUG的密码子)

[0540] [图28-1]图28-1是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是AUU,AUC,AUA,AUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的各肽的翻译量显示于图的纵轴(具体的测定值参考表33-1)。

[0541] tRNA:化合物AA_tR-56(反密码子:uau、氨基酸:Ile)

[0542] tRNA浓度:12.8μM

[0543] 6.4μM

[0544] 3.2μM

[0545] 1.6μM

[0546] 0.8μM

[0547] mRNA:mR-38(包含AUU的密码子)

[0548] mR-39(包含AUC的密码子)

[0549] mR-40(包含AUA的密码子)

[0550] mR-41(包含AUG的密码子)

[0551] [图28-2]图28-2是显示如实施例6~7中记载、氨酰化tRNA的浓度不同的条件下评价目的肽和交叉阅读的翻译量的各自的变化结果的图。评价的密码子是AUU,AUC,AUA,AUG。用以下中记载的tRNA和mRNA的各自的组合进行翻译,其结果得到的相对于[各肽的翻译量]的[目的肽的翻译量]的比显示于图的纵轴(具体的测定值参考表33-2)。

[0552] tRNA:化合物AAtR-56(反密码子:uau、氨基酸:Ile)

[0553] tRNA浓度:12.8 μ M

[0554] 6.4 μ M

[0555] 3.2 μ M

[0556] 1.6 μ M

[0557] 0.8 μ M

[0558] mRNA:mR-38(包含AUU的密码子)

[0559] mR-39(包含AUC的密码子)

[0560] mR-40(包含AUA的密码子)

[0561] mR-41(包含AUG的密码子)

[0562] 用于实施发明的方式

[0563] I. 定义

[0564] 为了解释本说明书的目的,适用以下定义,该情形均为,以单数形式使用的术语也包括复数,反之亦然。应理解,本说明书中使用的术语仅以说明特定方式为目的,不意图进行限定。在下述定义的任一与通过参考引入本说明书的任何文件矛盾的情形中,以下述定义为准。

[0565] “密码子”是生物体内的遗传信息翻译为蛋白时与各氨基酸对应的3个核苷的组合(三联体)。DNA的情形应用腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、和胸腺嘧啶(T)4种碱基,mRNA的情形应用腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、和尿嘧啶(U)4种碱基。显示各密码子与氨基酸的对应关系的表称为遗传密码表或密码子表,对除终止密码子的61种密码子分配20种氨基酸(表1)。由于表1中记载的遗传密码表在真核生物和原核生物(真细菌和古细菌)中几乎所有生物中共通使用,也称为标准遗传密码表或通用遗传密码表。在本公开中,将天然存在的生物中使用的遗传密码表称为天然的遗传密码表,与人工重编程的(密码子与氨基酸的对应关系被改变)遗传密码表相区分。在遗传密码表中,通常,第1个字母和第2个字母共通、仅第3个字母不同的4个密码子归为一个框,将它们称为密码子框。

[0566] [表1]

[0567]

	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	终止	UGA	终止	A
	UUG		UCG		UAG		UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

[0568] 在本公开中，mRNA中的密码子有时由“ $M_1M_2M_3$ ”表示。此处， M_1 、 M_2 和 M_3 分别表示密码子的第1个字母、第2个字母、和第3个字母的核苷。

[0569] “反密码子”是与mRNA上的密码子对应的、tRNA上的3个连续的核苷。与mRNA同样地，反密码子中应用腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、和尿嘧啶(U) 4种碱基。进一步，有时也应用修饰它们得到的修饰碱基。通过密码子被反密码子特异性识别，mRNA上的遗传信息被读取，翻译为蛋白。由于mRNA上的5'至3'方向的密码子序列与tRNA上的5'至3'方向的反密码子序列互补结合，密码子的第1个字母、第2个字母、和第3个字母的核苷与反密码子的第3个字母、第2个字母、和第1个字母的核苷之间分别形成互补的碱基对。

[0570] 在本公开中，tRNA中的反密码子有时由“ $N_1N_2N_3$ ”表示。此处， N_1 、 N_2 、和 N_3 分别表示反密码子的第1个字母、第2个字母、和第3个字母的核苷。按照后述的tRNA编号规则， N_1 、 N_2 、和 N_3 分别编号为tRNA的34位、35位、和36位。

[0571] 在本公开中，将可形成热力学稳定的碱基对的核酸的组合称为彼此“互补的”。除腺苷和尿苷(A-U)、鸟苷和胞苷(G-C)等沃森-克里克型碱基对，形成鸟苷和尿苷(G-U)、肌苷和尿苷(I-U)、肌苷和腺苷(I-A)、肌苷和胞苷(I-C)等非沃森-克里克型碱基对的核酸的组合也包含在本公开中的“互补的”核酸的组合中。特别地，密码子的第1个字母和反密码子的第3个字母、密码子的第2个字母和反密码子的第2个字母之间仅容许形成沃森-克里克型碱基对，与之相对，密码子的第3个字母和反密码子的第1个字母之间存在空间波动(摆动)，因此，认为也容许如上述非沃森-克里克型碱基对的形成(波动假说)。

[0572] “信使RNA(messenger RNA;mRNA)”是具有可翻译为蛋白的遗传信息的RNA。遗传信息作为密码子在mRNA上编码，它们与总共20种氨基酸分别对应。蛋白的翻译从起始密码子开始，在终止密码子终止。真核生物中的起始密码子作为原则是AUG，原核生物(真细菌和古细菌)中除AUG外GUG和UUG等有时也作为起始密码子使用。AUG是编码蛋氨酸(Met)的密码

子,真核生物和古细菌中直接从蛋氨酸起始翻译。另一方面,真细菌中,由于仅起始密码子的AUG与N-甲酰基蛋氨酸(fMet)对应,从甲酰基蛋氨酸起始翻译。终止密码子有UAA(赭石)·UAG(琥珀)·UGA(蛋白石)3种。终止密码子被称为翻译终结因子(释放因子;RF)的蛋白识别时,迄今合成的肽链从tRNA解离,翻译步骤结束。

[0573] “转运RNA(transfer RNA;tRNA)”是以mRNA为模板介导肽合成的100个碱基以下的短RNA。在二次结构上,由3个茎环(D臂、反密码子臂、T臂)和1个茎(受体茎)组成,具有三叶草状结构。通过tRNA有时进一步包含1个可变环。反密码子臂中存在由称为反密码子的3个连续的核苷组成的区,通过反密码子与mRNA上的密码子形成碱基对,密码子被识别。另一方面,tRNA的3'末端存在由胞苷-胞苷-腺苷组成的核酸序列(CCA序列),其末端的腺苷残基添加了氨基酸(具体地,腺苷残基的核糖的2位或3位的羟基与氨基酸的羧基形成酯键)。添加了氨基酸的tRNA称为氨酰tRNA。在本公开中,氨酰tRNA也包含在tRNA的定义中。此外,如后述,已知从tRNA的CCA序列除去末端的2个残基(C和A)、将其用于氨酰tRNA的合成方法。这样的3'末端的CA序列被除去的tRNA也包含在本公开中的tRNA的定义中。在生物体内,向tRNA的氨基酸添加通过称为氨酰tRNA合成酶(aminoacyl-tRNA synthetase;aaRS或ARS)的酶进行,通常,每一氨基酸存在1种氨酰tRNA合成酶,并且各自的氨酰tRNA合成酶特异性识别来自多个tRNA中仅特定的tRNA作为底物,因此,tRNA与氨基酸的对应关系被严格控制。

[0574] tRNA中的各核苷按照tRNA编号规则进行编号(Sprinzi et al.,Nucleic Acids Res (1998) 26:148-153)。例如,分别地,反密码子编号为34位~36位,CCA序列编号为74~76位。

[0575] “起始tRNA(initiator tRNA)”是mRNA翻译起始时使用的特定的tRNA。通过结合起始氨基酸的起始tRNA被翻译起始因子(initiation factor;IF)催化导入核糖体、与mRNA上的起始密码子结合,起始翻译。由于作为起始密码子,通常应用作为蛋氨酸的密码子的AUG,起始tRNA具有与AUG对应的反密码子,此外,结合作为起始氨基酸的蛋氨酸(原核生物中甲酰基蛋氨酸)。

[0576] “延伸tRNA(elongator tRNA)”是翻译步骤中肽链的延伸反应中使用的tRNA。在肽合成中,结合了氨基酸的延伸tRNA通过GTP化的翻译延伸因子(elongation factor;EF)EF-Tu/eEF-1依次转运至核糖体,从而进行肽链的延伸反应。

[0577] 本公开中的“tRNA体(tRNA body)”指除去反密码子(34~36位)的tRNA的本体部分(由核酸构成的主要结构部分)。在几个方式中,本公开的tRNA体指tRNA的1~33位和37~76位。在另一方式中,本公开的tRNA体指tRNA的1~33位和37~74位。

[0578] “赖胞苷(lysidine)”是修饰核苷的一种,也表述为2-赖氨酰胞苷(2-lysylcytidine;k2C或L)。赖胞苷在与真细菌中的异亮氨酸对应的tRNA(tRNA Ile2)中用作反密码子的第1个字母的核苷。对于tRNA Ile2,以具有CAU的反密码子的前体状态合成后,通过称为tRNA Ile-赖胞苷合成酶(tRNA Ile-lysidine synthetase;TilS)的酶的作用,反密码子的第1个字母的胞苷(C)改变(转换)为赖胞苷(k2C)。其结果,具有k2CAU的反密码子的tRNA Ile2完成(Muramatsu et al.,J Biol Chem(1988) 263:9261-9267、Suzuki et al.,FEBS Lett (2010) 584:272-277)。已知k2CAU的反密码子仅特异性识别异亮氨酸的密码子AUA。此外,认为通过反密码子改变为k2CAU,首次通过异亮氨酰tRNA合成酶将tRNA Ile2识别为底物,引起tRNA Ile2的氨酰化(异亮氨酸的添加)。

[0579] “胍丁胺胞苷 (agmatidine)”是修饰核苷的一种,也表述为2-胍丁胺基胞苷 (2-agmatinylcytidine; agm2C或Agm)。胍丁胺胞苷在古细菌中与异亮氨酸对应的tRNA (tRNA Ile2) 中用作反密码子的第1个字母的核苷。对于tRNA Ile2,以具有CAU的反密码子的前体状态合成后,通过称为tRNA Ile-胍丁胺胞苷合成酶 (tRNA Ile-agmatidine synthetase; TiaS) 的酶的作用,反密码子的第1个字母的胞苷 (C) 改变 (转换) 为胍丁胺胞苷 (agm2C)。其结果,具有agm2CAU的反密码子的tRNA Ile2完成 (Ikeuchi et al., Nat Chem Biol (2010) 6 (4):277-282)。已知agm2CAU的反密码子仅特异性识别异亮氨酸的密码子AUA。此外,认为通过反密码子改变为agm2CAU,首次通过异亮氨酰tRNA合成酶将tRNA Ile2识别为底物,引起tRNA Ile2的氨酰化 (异亮氨酸的添加)。

[0580] 本公开中的“交叉阅读”意味着某氨酰tRNA通过也识别本来应该识别的密码子以外的密码子而额外翻译为目的以外的氨基酸的现象。目的以外的氨基酸被翻译的程度没有特别限定,通常指判断为未充分实现翻译的正交性的水平。

[0581] 本公开中的“烷基”是从脂肪族烃除去任意1个氢原子衍生的1价基团,具有骨架中不含杂原子或不饱和碳-碳键、含有氢和碳原子的烃基或烃基结构的子集。碳链的长度n是1~20个范围,作为烷基,列举例如C₁-C₁₀烷基、C₁-C₆烷基、C₁-C₃烷基等,具体地,列举甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、异丙基、叔丁基、仲丁基、1-甲基丙基、1,1-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,2,2-三甲基丙基、1,1,2,2-四甲基丙基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1-乙基丁基、2-乙基丁基、异戊基、新戊基等。

[0582] 本公开中的“环烷基”意味着饱和或部分饱和的环状1价脂肪族烃基,包含单环、双环、螺环。作为环烷基,列举例如C₃-C₁₀环烷基,具体地,列举环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、双环[2.2.1]庚基等。

[0583] 本公开中的“烯基”是具有至少1个双键 (2个相邻SP²碳原子) 的1价基团。根据双键和取代基 (存在时) 的构型,双键的几何学形式可以采取entgegen (E) 或zusammen (Z)、顺式或反式构型。列举直链状或支链状的烯基,包括含有内部烯烃的直链等。作为烯基,列举例如C₂-C₁₀烯基、C₂-C₆烯基等,具体地,列举乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基 (包括顺式、反式)、3-丁烯基、戊烯基、己烯基等。

[0584] 本公开中的“炔基”是具有至少1个三键 (2个相邻SP碳原子) 的1价基团。列举直链状或支链状的炔基,包含内部亚烷基。作为炔基,列举例如C₂-C₁₀炔基、C₂-C₆炔基等,具体地,列举乙炔基、1-丙炔基、炔丙基、3-丁炔基、戊炔基、己炔基、3-苯基-2-丙炔基、3- (2'-氟苯基) -2-丙炔基、2-羟基-2-丙炔基、3- (3-氟苯基) -2-丙炔基、3-甲基- (5-苯基) -4-戊炔基等。

[0585] 本公开中的“芳基”意味着1价芳香族烃环。作为芳基,列举例如C₆-C₁₀芳基,具体地,列举苯基、萘基 (例如,1-萘基、2-萘基) 等。

[0586] 本公开中的“杂芳基”意味着构成环的原子中含有杂原子的芳香族性的环的1价基团,可以部分饱和。环可以是单环、或2个的稠环 (例如,与苯或单环杂芳基稠合的双环杂芳基)。构成环的原子数例如5-10个 (5元-10元杂芳基)。构成环的原子中包含的杂原子数例如1-5个。作为杂芳基,具体地,列举呋喃基、噻吩基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑

基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、三嗪基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻二唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并噁二唑基、苯并咪唑基、吡啶基、异吡啶基、吡唑基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹唑啉基、喹喔啉基、苯并间二氧杂环戊烯基、中氮茛基、咪唑并吡啶基等。

[0587] 本公开中的“芳基烷基(芳烷基)”意味着共同包含芳基和烷基的基团,例如,前述烷基的至少一个氢原子被芳基取代的基团。作为芳烷基,列举例如C₅-C₁₀芳基C₁-C₆烷基,具体地,列举苄基等。

[0588] 本公开中的“亚烷基”意味着从前述“烷基”进一步除去任意1个氢原子衍生的二价基团,可以是直链状也可以是支链状。作为直链亚烷基,列举C₂-C₆直链亚烷基、C₄-C₅直链亚烷基等,具体地,列举-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-(CH₂)₆-等。作为支链亚烷基,列举C₂-C₆支链亚烷基、C₄-C₅支链亚烷基等,具体地,列举-CH(CH₃)CH₂-、-C(CH₃)₂-、-CH(CH₃)CH₂CH₂-、-C(CH₃)₂CH₂-、-CH₂CH(CH₃)CH₂-、-CH₂C(CH₃)₂-、-CH₂CH₂CH(CH₃)-等。

[0589] 本公开中的“亚烯基”意味着从前述“烯基”进一步除去任意1个氢原子衍生的二价基团,可以是直链状也可以是支链状。根据双键和取代基(存在时)的构型,可以采取 entgegen (E) 或 zusammen (Z)、顺式或反式构型。作为直链亚烯基,列举C₂-C₆直链亚烯基、C₄-C₅直链亚烯基等,具体地,列举-CH=CH-、-CH=CHCH₂-、-CH₂CH=CH-、-CH=CHCH₂CH₂-、-CH₂CH=CHCH₂-、-CH₂CH₂CH=CH-、-CH=CHCH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH=CHCH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH=CHCH₂-、-CH₂CH₂CH₂CH=CH-等。

[0590] 本公开中的“亚芳基”意味着从前述芳基进一步除去任意1个氢原子衍生的2价基团。环可以是单环也可以是稠环。构成环的原子数没有特别限定,例如6-10个(C₆-C₁₀亚芳基)。作为亚芳基,具体地,列举亚苯基、亚萘基等。

[0591] 本公开中的“杂亚芳基”意味着从前述杂芳基进一步除去任意1个氢原子衍生的2价基团。环可以是单环也可以是稠环。构成环的原子数没有特别限定,例如5-10个(5元~10元杂亚芳基)。作为杂亚芳基,具体地,列举吡咯二基、咪唑二基、吡唑二基、吡啶二基、哒嗪二基、嘧啶二基、吡嗪二基、三唑二基、三嗪二基、异噁唑二基、噁唑二基、噁二唑二基、异噻唑二基、噻唑二基、噻二唑二基、呋喃二基、噻吩二基等。

[0592] 本公开中的“翻译系统”定义为包括用于翻译肽的方法以及用于翻译肽的组合物和试剂盒两者的概念。翻译系统中通常包含核糖体、翻译因子、tRNA、氨基酸、氨酰tRNA合成酶(aaRS)、和ATP及GTP等肽的翻译反应所需的因子作为构成成分。作为翻译系统的主要种类,有利用活细胞的翻译系统、和利用细胞提取液的翻译系统(无细胞翻译系统)。作为利用活细胞的翻译系统,例如,已知通过显微注射法或脂质转染法将期望的氨酰tRNA和mRNA导入非洲爪蟾卵母细胞和哺乳动物细胞等活细胞进行肽翻译的系统(Nowak et al., Science (1995) 268:439-442)。作为无细胞翻译系统的实例,已知来自大肠杆菌(Chen et al., Methods Enzymol (1983) 101:674-690)、酵母(Gasior et al., J Biol Chem (1979) 254:3965-3969)、小麦胚芽(Erickson et al., Methods Enzymol (1983) 96:38-50)、兔网织红细胞(Jackson et al., Methods Enzymol (1983) 96:50-74)、HeLa细胞(Barton et al., Methods Enzymol (1996) 275:35-57)、或昆虫细胞(Swerdel et al., Comp Biochem Physiol B (1989) 93:803-806)等的提取液的翻译系统。这样的翻译系统可以由本领域技术人员通过公知的方法或基于其的方法适当配制。无细胞翻译系统中也包含将肽翻译所需的

因子分别分离・纯化、将它们重构而构建的翻译系统(重构型的无细胞翻译系统)(Shimizu et al., Nat Biotech(2001) 19:751-755)。重构型的无细胞翻译系统中通常可包含核糖体、氨基酸、tRNA、氨酰tRNA合成酶(aaRS)、翻译起始因子(例如, IF1、IF2、IF3)、翻译延伸因子(例如EF-Tu、EF-Ts、EF-G)、翻译终结因子(例如RF1、RF2、RF3)、核糖体循环因子(ribosome recycling factor; RRF)、作为能源的NTP类、能量再生系统、和翻译所需的其它因子等。还进行从DNA的转录反应的情形可进一步包含RNA聚合酶等。无细胞翻译系统中包含的各种因子可以由本领域技术人员通过公知的方法分离・纯化, 可以应用它们适当构建重构型的无细胞翻译系统。或者, 也可以利用Gene Frontier公司的PUREfrex(注册商标)、和New England BioLabs公司的PURExpress(注册商标)等市售的重构型无细胞翻译系统。重构型无细胞翻译系统的情形可以仅重构翻译系统的构成成分中必需的成分、构建期望的翻译系统。

[0593] 通过氨基酸・tRNA・氨酰tRNA合成酶的特异性组合, 合成氨酰tRNA, 将其用于肽的翻译。替代上述组合, 也可以将氨酰tRNA原样用作翻译系统的构成成分。特别地, 在非天然氨基酸等、难以用氨酰tRNA合成酶氨酰化的氨基酸用于翻译的情形中, 期望将预先用非天然氨基酸氨酰化的tRNA用作构成成分。

[0594] 通过在翻译系统中加入mRNA, 其翻译被起始。mRNA中通常包含编码目的肽的序列, 进一步, 可以包含用于提高翻译反应的效率的序列(例如, 原核生物中的Shine-Dalgarno(Shine-Dalgarno; SD)序列、真核生物中的Kozac(Kozac)序列等)。可以将预先转录的mRNA直接加入系统, 也可以通过代替mRNA、将包含启动子的模板DNA和与其适应的RNA聚合酶(例如T7启动子和T7 RNA聚合酶等)加入系统从模板DNA转录mRNA。

[0595] 在本说明书中, 显示数值范围的“~”包含其两端的值, 例如, “A~B”意味着A以上并且B以下的数值范围。

[0596] 在本说明书中, “和/或”的术语的意义包括“和”与“或”适当组合的所有组合。具体地, 例如, “A、B、和/或C”包括以下7种变化:

[0597] (i) A、(ii) B、(iii) C、(iv) A和B、(v) A和C、(vi) B和C、(vii) A、B、和C。

[0598] II. 翻译系统和翻译系统的制备方法

[0599] 在一方面, 本公开提供翻译系统, 其包含具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA。在一方面, 在本公开中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。本公开中的翻译系统中包含的2种tRNA的各自可以是结合了相互不同的氨基酸或氨基酸类似物的氨酰tRNA。本公开中的tRNA可以选择性翻译由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子。因此, 通过使用包含本公开的tRNA的翻译系统, 可以从一个密码子框(该密码子框由由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子组成)翻译至少2种氨基酸或氨基酸类似物。

[0600] 本公开中由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子中, 包含可通过 M_1 选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种、 M_2 选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种指定的全部组合。

[0601] 另外, 本公开中的“选择性翻译密码子”的表述也可以与“区别读出密码子”、“减少交叉阅读”互换, 它们可解释为同一含义。

[0602] 在一方面,本公开提供翻译系统,其包含:具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA。在又一方面,本公开提供翻译系统,其包含:具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA。在一方面,在本公开中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。本公开中的翻译系统中包含的3种tRNA各自可以是结合了相互不同的氨基酸或氨基酸类似物的氨酰tRNA。在一方面,本公开中的tRNA可以选择性翻译由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子。在又一方面,本公开中的tRNA可以选择性翻译由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子。因此,通过使用本公开的包含tRNA的翻译系统,可以从一个密码子框(该密码子框由由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子构成)翻译至少3种氨基酸或氨基酸类似物。

[0603] 本公开中由 M_1M_2U 表示的密码子和由 M_1M_2C 表示的密码子中,包含可通过 M_1 选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种、 M_2 选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种指定的全部组合。

[0604] 本公开中的翻译系统中包含多个不同种类的tRNA,可以从这些tRNA翻译多个不同种类的氨基酸或氨基酸类似物。在一方面,本公开提供用于选择性翻译密码子的组合物和试剂盒,其包含适于肽翻译的多个不同种类的tRNA。在另一方面,本公开提供用于选择性翻译密码子的方法,其包括在包含适于肽翻译的多个不同种类的tRNA的翻译系统中翻译核酸的步骤。在特定的方面,前述多个不同种类的tRNA中包含本公开的tRNA。

[0605] 作为本公开中的可选择性翻译的密码子的组合,示例由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子的组合、由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子的组合、以及由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子的组合。

[0606] 在本公开中的翻译系统中,在一个方式中,可以包含分别含有一个或多个由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子的核酸。此外,在本公开中的翻译系统中,在一个方式中,可以包含(i)分别含有一个或多个由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子的核酸、或(ii)分别含有一个或多个由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子的核酸。此外,在一个方式中,在本公开中的翻译系统中,可以包含分别含有一个或多个由 M_1M_2A 表示的密码子、由 M_1M_2G 表示的密码子、由 M_1M_2U 表示的密码子、和由 M_1M_2C 表示的密码子的核酸。在一个方式中,本公开中的翻译系统可以包含1种或多种这样的核酸。

[0607] 在一方面,本公开涉及翻译系统的制备方法。本公开中的翻译系统的制备方法包括使氨基酸或氨基酸类似物在翻译系统外和/或人工地与tRNA结合的步骤。在一方面,本公开中的翻译系统的制备方法进一步包括将结合了氨基酸或氨基酸类似物的tRNA与本公开中的翻译系统混合的步骤。

[0608] 翻译系统中通常包含核糖体、翻译因子、tRNA、氨基酸、氨酰tRNA合成酶(aaRS)、和ATP及GTP等肽的翻译反应所必要的因子作为构成成分。特别地,在重构型无细胞翻译系统

的情形中,可以仅重构翻译系统的构成成分中必要的成分、构建期望的翻译系统。翻译系统中氨酰tRNA(添加了氨基酸或氨基酸类似物的tRNA)的合成可以在翻译系统内进行,也可以在翻译系统外进行。此外,翻译系统内的合成和翻译系统外的合成可以联用。

[0609] 在几个方式中,本公开中的具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与翻译系统外的氨基酸或氨基酸类似物结合。在几个方式中,本公开中的具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与翻译系统外的氨基酸或氨基酸类似物结合。在几个方式中,本公开中的具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与翻译系统外的氨基酸或氨基酸类似物结合。在进一步的方式中,翻译系统中包含的上述以外的tRNA可以与翻译系统内的氨基酸或氨基酸类似物结合,也可以与翻译系统外的氨基酸或氨基酸类似物结合。

[0610] 在本公开中,tRNA优选人工连接了氨基酸或氨基酸类似物的那种。tRNA可以是来自任意生物(例如大肠杆菌等)的天然tRNA,或也可以是具有与天然tRNA不同的序列、人工合成的非天然tRNA。或者,可以是具有与天然tRNA相同的序列、人工合成的tRNA。此外,本公开中的tRNA可以是“体外转录合成的tRNA”。

[0611] 在几个方式中,在本公开中的tRNA是具有与天然tRNA不同的序列的改变的tRNA的情形中,该改变的tRNA可以包含相对于构成tRNA的1个以上的核苷的选自以下组的至少1个以上的改变:(i)添加(向现有tRNA添加任意新核苷)、(ii)缺失(从现有tRNA去除任意核苷)、(iii)取代(将现有tRNA中的任意核苷替换为另一任意核苷)、(iv)插入(在现有tRNA中的任意2个核苷之间追加新的任意核苷)、(v)修饰(使现有tRNA中任意核苷的结构的一部分(例如碱基部分或糖部分)改变为另一结构)。改变可以相对于tRNA的任何结构(例如D臂、反密码子臂、T臂、受体茎、可变环等)进行。在几个方式中,本公开中的tRNA的改变相对于反密码子臂中包含的反密码子进行。在进一步的方式中,本公开中的tRNA的改变相对于反密码子的第1个字母、第2个字母、和第3个字母的核苷中的至少1个进行。按照tRNA中核苷的编号规则时,反密码子的第1个字母、第2个字母、和第3个字母的核苷分别对应于tRNA的34位、35位、和36位。在本说明书中,有时将反密码子的第1个字母、第2个字母、和第3个字母的核苷分别表述为 N_1 、 N_2 、和 N_3 。本公开的tRNA中改变的核苷的数目可以是1以上的任意数目。在几个方式中,本公开的tRNA中改变的核苷的数目是20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下、或1。在另一方式中,改变后的tRNA的核酸序列与改变前的核酸序列相比80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或99%以上相同。在本公开中,相对于某碱基序列的“百分比(%)序列同一性”定义为,在排列序列并且必要时导入空隙以得到最大百分比序列同一性后、并且任何保守取代都考虑为序列同一性的一部分时、与参考碱基序列中的碱基相同的候选序列中的碱基的百分率比。目的为确定碱基序列的百分比序列同一性的比对可以通过使用该技术领域中的技术范围内的各种方法例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign(DNASTAR)软件、或GENETYX(注册商标)(株式会社Genetics)等可公开得到的计算机软件实现。本领域技术人员可以确定用于序列的比对的适当参数,包括用于在比较的序

列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0612] 在几个方式中,本公开中的tRNA的改变意味着取代构成tRNA的1个以上的核苷。关于核苷的种类,取代后的核苷可以是天然tRNA中存在的任一种核苷,也可以是天然tRNA中不存在的任意核苷(人工合成的核苷)。天然tRNA中除作为4个典型核苷的腺苷、鸟苷、胞苷和尿苷外还包含将它们修饰得到的变体(修饰核苷)。在几个方式中,天然tRNA中存在的核苷可从以下的核苷中选择:腺苷(adenosine;A)、胞苷(cytidine;C)、鸟苷(guanosine;G)、尿苷(uridine;U)、1-甲基腺苷(1-methyladenosine;m1A)、2-甲基腺苷(2-methyladenosine;m2A)、N6-异戊烯基腺苷(N6-isopentenyladenosine;i6A)、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷(2-methylthio-N6-isopentenyladenosine;ms2i6A)、N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine;m6A)、N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷(N6-threonylcarbamoyladenosine;t6A)、N6-甲基-N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷(N6-methyl-N6-threonylcarbamoyladenosine;m6t6A)、2-甲硫基-N6-苏氨酰氨基甲酰基腺苷(2-methylthio-N6-threonylcarbamoyladenosine;ms2t6A)、2'-O-甲基腺苷(2'-O-methyladenosine;Am)、肌苷(inosine;I)、1-甲基肌苷(1-methylinosine;m1I)、2'-O-核糖基腺苷(磷酸盐)(2'-O-ribosyladenosine(phosphate);Ar(p))、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷(N6-(cis-hydroxyisopentenyl)adenosine;io6A)、2-硫代胞苷(2-thiocytydine;s2C)、2'-O-甲基胞苷(2'-O-methylcytydine;Cm)、N4-乙酰基胞苷(N4-acetylcytydine;ac4C)、5-甲基胞苷(5-methylcytydine;m5C)、3-甲基胞苷(3-methylcytydine;m3C)、赖胞苷(lysidine;k2C)、5-甲酰基胞苷(5-formylcytydine;f5C)、2'-O-甲基-5-甲酰基胞苷(2'-O-methyl-5-formylcytydine;f5Cm)、胍丁胺胞苷(agmatidine;agm2C)、2'-O-核糖基鸟苷(磷酸盐)(2'-O-ribosylguanosine(phosphate);Gr(p))、1-甲基鸟苷(1-methylguanosine;m1G)、N2-甲基鸟苷(N2-methylguanosine;m2G)、2'-O-甲基鸟苷(2'-O-methylguanosine;Gm)、N2,N2-二甲基鸟苷(N2,N2-dimethylguanosine;m22G)、N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷(N2,N2,2'-O-trimethylguanosine;m22Gm)、7-甲基鸟苷(7-methylguanosine;m7G)、古嘌呤(archaeosine;G*)、癸苷(queuosine;Q)、甘露糖基癸苷(mannosylqueuosine;manQ)、半乳糖基癸苷(galactosylqueuosine;galQ)、怀丁苷(wybutosine;yW)、过氧基怀丁苷(peroxywybutosine;o2yW)、5-甲基氨基甲基尿苷(5-methylaminomethyluridine;mmn5U)、2-硫代尿苷(2-thiouridine;s2U)、2'-O-甲基尿苷(2'-O-methyluridine;Um)、4-硫代尿苷(4-thiouridine;s4U)、5-氨基甲酰基甲基尿苷(5-carbamoylmethyluridine;ncm5U)、5-甲氧基羰基甲基尿苷(5-methoxycarbonylmethyluridine;mcm5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷(5-methylaminomethyl-2-thiouridine;mmn5s2U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷(5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine;mcm5s2U)、尿苷5-氧基乙酸(uridine5-oxyacetic acid;cmo5U)、5-甲氧基尿苷(5-methoxyuridine;mo5U)、5-羧甲基氨基甲基尿苷(5-carboxymethylaminomethyluridine;cmnm5U)、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷(5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine;cmnm5s2U)、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine;acp3U)、5-(羧基羟甲基)尿苷甲酯(5-(carboxyhydroxymethyl)uridinemethyl ester;mchm5U)、5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷(5-carboxymethylaminomethyl-2'-O-methyluridine;cmnm5Um)、5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷(5-carbamoylmethyl-2'-O-methyluridine;ncm5Um)、二氢尿苷

(dihydrouridine; D)、假尿苷(pseudouridine; Ψ)、1-甲基假尿苷(1-methylpseudouridine; m Ψ)、2'-O-甲基假尿苷(2'-O-methylpseudouridine; Ψ m)、5-甲基尿苷(5-methyluridine; m5U)、5-甲基-2-硫代尿苷(5-methyl-2-thiouridine; m5s2U)、5,2'-O-二甲基尿苷(5,2'-O-dimethyluridine; m5Um)。

[0613] 本公开中的改变的tRNA可以从具有任意核酸序列的tRNA中适当选择。在几个方式中,tRNA是tRNA Ala、tRNA Arg、tRNA Asn、tRNA Asp、tRNA Cys、tRNA Gln、tRNA Glu、tRNA Gly、tRNA His、tRNA Ile、tRNA Leu、tRNA Lys、tRNA Met、tRNA Phe、tRNA Pro、tRNA Ser、tRNA Thr、tRNA Trp、tRNA Tyr、tRNA Val的任一种。除上述20种tRNA以外,还可应用tRNA fMet和tRNA Sec(硒代半胱氨酸)、tRNA Pyl(吡咯赖氨酸)、tRNA AsnE2等。在特定的方式中,tRNA是tRNA Glu、tRNA Asp、tRNA AsnE2、tRNA(fMet)、tRNA(Ile)的任一种。有时也应用指代tRNA的本体部分(由核酸构成的主要结构部分)的术语tRNA体。

[0614] 另外,在本公开中,tRNA有时如下表述。

[0615] • “tRNA Xxx”或“tRNA(Xxx)”表示对应于...氨基酸Xxx的tRNA(全长)(例如tRNA Glu和tRNA(Glu)等)。

[0616] • “tRNA(Xxx)nnn”表示作为对应于...氨基酸Xxx的tRNA的、反密码子序列是nnn的tRNA(全长)(例如tRNA(Glu) uga和tRNA(Glu) Lga等)。

[0617] • “tRNA(Xxx)nnn-CA”表示作为对应于...氨基酸Xxx的tRNA的、反密码子序列是nnn的tRNA(除去了3'末端的CA序列的那种)(例如tRNA(Glu) uga-CA和tRNA(Glu) Lga-CA等)。

[0618] 在几个方式中,本公开的tRNA是起始tRNA或延伸tRNA。通过改变起始tRNA或延伸tRNA可以制备tRNA,通过改变制备的tRNA可以具有作为起始tRNA或延伸tRNA的功能。某tRNA是否具有作为起始tRNA的功能可以如下判断,在翻译系统中应用该tRNA的情形中,(i)经由IF2导入核糖体,并且(ii)将与该tRNA结合的氨基酸用作起始氨基酸,是否可以起始肽翻译。此外,某tRNA是否具有作为延伸tRNA的功能可以如下判断,在翻译系统中应用该tRNA的情形中,(i)经由EF-Tu导入核糖体,并且(ii)将与该tRNA结合的氨基酸掺入肽链,是否可以延伸肽链。

[0619] 在几个方式中,本公开的tRNA是来自原核生物的tRNA或来自真核生物的tRNA。通过改变来自原核生物的tRNA或来自真核生物的tRNA可以制备突变tRNA,通过改变制备的tRNA与来自原核生物的tRNA或来自真核生物的tRNA可以具有最高的核酸序列同一性。真核生物进一步分类为动物、植物、菌类和原生生物。本公开的tRNA可以是例如来自人的tRNA。原核生物进一步分类为真细菌和古细菌。作为真细菌,可以列举例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌、或哈夫尼脱硫杆菌(*Desulfitobacterium hafniense*)等。作为古细菌,可以列举例如极端嗜盐菌、嗜热菌或产甲烷菌(例如马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)、巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)、詹氏甲烷暖球菌(*Methanocaldococcus jannaschii*))等。本公开的tRNA可以是例如来自大肠杆菌或哈夫尼脱硫杆菌、马氏甲烷八叠球菌的tRNA。

[0620] 在几个方式中,本公开中的tRNA在反密码子、例如其第1个字母(N_1)可以不具有赖胞苷(k2C)、赖胞苷衍生物、胍丁胺胞苷(agm2C)、或胍丁胺胞苷衍生物的任一种。在特定的方式中,本公开中的tRNA在反密码子、例如其第1个字母(N_1)可以不具有赖胞苷(k2C)、赖胞

苷衍生物、胍丁胺胞苷 (agm2C)、或胍丁胺胞苷衍生物的任一种。

[0621] 例如,通过准备编码期望的tRNA基因的DNA、在其上游配置T7、T3、或SP6等适当启动子、以该DNA为模板应用适于各启动子的RNA聚合酶进行转录反应,可以合成tRNA。此外,tRNA可以通过从生物学材料纯化配制。例如,通过从细胞等包含tRNA的材料配制提取液、向其添加包含与tRNA的核酸序列互补的序列的探针,可以回收tRNA。此时,也可以准备可表达期望的tRNA的表达载体,以用该表达载体转化的细胞为材料进行配制。通过体外转录合成的tRNA中通常仅包含作为4个典型核苷的腺苷、鸟苷、胞苷、和尿苷。另一方面,细胞内合成的tRNA中有时也包含修饰它们得到的修饰核苷等。或者,通过将通过转录合成的片段或如后述实施例中记载地化学合成的片段等通过酶反应连接的方法,也可以配制tRNA。

[0622] 氨酰tRNA也可以通过化学的和/或生物学的合成法配制。例如,通过应用氨酰tRNA合成酶(ARS),使氨基酸与tRNA结合,可以合成氨酰tRNA。只要氨基酸作为ARS的底物得到,可以是天然氨基酸,也可以是非天然氨基酸。或者,可以在使天然氨基酸与tRNA结合后,向氨基酸加入化学修饰。此外,也报告了许多通过向ARS导入氨基酸突变、对非天然氨基酸的作用提高的实例(参考例如W02006/135096、W02007/061136、W02007/103307、W02008/001947、W02010/141851、W02015/120287等),应用这样的突变ARS,可以使氨基酸与tRNA结合。除应用ARS的方法以外,例如,通过从tRNA的3'末端除去CA序列、应用RNA连接酶使氨酰化的pdCpA(由脱氧胞苷和腺苷构成的二核苷酸)与其结合,可以合成氨酰tRNA(pdCpA法;Hecht et al.,J Biol Chem(1978) 253:4517-4520)。替代pdCpA应用pCpA(由胞苷和腺苷构成的二核苷酸)的方法也是已知的(pCpA法;Wang et al.,ACS Chem Biol(2015) 10:2187-2192)。即,用RNA连接酶使pCpA-氨基酸和3'末端的CA缺损的tRNA结合,可以配制氨酰化tRNA。此外,通过使预先通过酯化活化的非天然型氨基酸应用人工RNA催化剂(flexizyme)与tRNA结合,也可以合成氨酰tRNA(W02007/066627、W02012/026566、H.Murakami et al.,Chemistry&Biology,Vol.10,2003,655-662;H.Murakami et al.,Chemistry & Biology,Vol.10,2003,1077-1084;H.Murakami et al.,Nature Methods 3,2006,357-359;N.Niwa et al.,Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19,2009,3892-3894)。flexizyme是可以将氨基酸或羧基酸与tRNA连接的人工RNA催化剂。本公开中的flexizyme中还包括原始flexizyme(Fx)、和从其改变的二硝基苄基flexizyme(dFx)、增强flexizyme(eFx)、氨基flexizyme(aFx)等。

[0623] 在几个方式中,本公开的tRNA中结合了氨基酸或氨基酸类似物。氨基酸或氨基酸类似物通常与tRNA的3'末端、更具体地3'末端的CCA序列的腺苷残基结合。与tRNA结合的氨基酸或氨基酸类似物的具体种类可以从以下记载的氨基酸或氨基酸类似物中分别适当选择。

[0624] 本公开中的氨基酸中包含 α -氨基酸、 β -氨基酸、 γ -氨基酸等。作为立体结构,还包含L型氨基酸、D型氨基酸的任一种。此外,本公开中的氨基酸包含天然氨基酸和非天然氨基酸。在特定的方式中,天然氨基酸由以下20种 α -氨基酸组成:甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)、组氨酸(His)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酰胺(Gln)、天冬酰胺(Asn)、半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)和脯氨酸(Pro)。或者,从上述20种氨基酸除去任意1种以上氨基酸的那种也可以作为本公开中的天然氨基酸。

在一个方式中,天然氨基酸由除异亮氨酸的19种氨基酸组成。在一个方式中,天然氨基酸由除蛋氨酸的19种氨基酸组成。在进一步的方式中,天然氨基酸由除异亮氨酸和蛋氨酸的18种氨基酸组成。天然氨基酸通常是L型氨基酸。

[0625] 在本公开中,非天然氨基酸表示除由上述20种 α -氨基酸组成的天然氨基酸的全部氨基酸。作为非天然氨基酸的实例,可以列举 β -氨基酸、 γ -氨基酸、D型氨基酸、侧链与天然氨基酸不同的 α -氨基酸、 α,α -二取代氨基酸、主链的氨基具有取代基的氨基酸(N取代氨基酸)等。非天然氨基酸的侧链没有特别限定,除氢原子之外,还可以具有例如烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基等。此外,在 α,α -二取代氨基酸的情形中,2个侧链可以形成环。进一步,这些侧链可以具有1个以上取代基。在特定的方式中,取代基可以从包括卤素原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子、或P原子的任意官能团中选择。例如,本公开中的“具有卤素为取代基的 C_1 - C_6 烷基”意味着烷基中至少一个氢原子被卤素原子取代的“ C_1 - C_6 烷基”,具体地,例如,包含三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、五氟乙基、四氟乙基、三氟乙基、二氟乙基、氟乙基、三氯甲基、二氯甲基、氯甲基、五氯乙基、四氯乙基、三氯乙基、二氯乙基、氯乙基等。此外,例如“具有取代基的 C_5 - C_{10} 芳基 C_1 - C_6 烷基”意味着芳基和/或烷基中至少一个氢原子由取代基取代的“ C_5 - C_{10} 芳基 C_1 - C_6 烷基”。进一步,“具有2个以上取代基”也包括具有某官能团(例如包含S原子的官能团)作为取代基、进一步该官能团具有另一取代基(例如氨基或卤素等取代基)。作为非天然氨基酸的具体实例,也可以参考W02013/100132和W02018/143145等。

[0626] 非天然氨基酸的主链的氨基可以是非取代的氨基(NH_2 基),有可以是取代的氨基(NHR基)。此处,R表示任选具有取代基的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基。此外,如脯氨酸,与主链的氨基的N原子结合的碳链和 α 位的碳原子可以形成环。取代基可以从包含卤素原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子、或P原子的任意官能团中选择。作为氨基的烷基取代的实例,列举N-甲基化、N-乙基化、N-丙基化、N-丁基化等,作为芳烷基取代的实例,列举N-苄基化等。作为N-甲基氨基酸的具体实例,可以列举N-甲基丙氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基苯丙氨酸、N-甲基酪氨酸、N-甲基-3-氯苯丙氨酸、N-甲基-4-氯苯丙氨酸、N-甲基-4-甲氧基苯丙氨酸、N-甲基-4-噻唑丙氨酸、N-甲基组氨酸、N-甲基丝氨酸、N-甲基天冬氨酸等。

[0627] 作为包含卤素原子的取代基的实例,列举氟(-F)、氯(-Cl)、溴(-Br)、碘(-I)等。

[0628] 作为包含O原子的取代基的实例,列举羟基(-OH)、氧基(-OR)、羰基(-C=O-R)、羧基(-CO₂H)、氧基羰基(-C=O-OR)、羰基氧基(-O-C=O-R)、硫代羰基(-C=O-SR)、羰基硫代(-S-C=O-R)、氨基羰基(-C=O-NHR)、羰基氨基(-NH-C=O-R)、氧基羰基氨基(-NH-C=O-OR)、磺酰基氨基(-NH-SO₂-R)、氨基磺酰基(-SO₂-NHR)、氨磺酰氨基(-NH-SO₂-NHR)、硫代羧基(-C(=O)-SH)、羧基羰基(-C(=O)-CO₂H)等。

[0629] 作为氧基(-OR)的实例,列举烷氧基、环烷氧基、烯基氧基、炔基氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、芳烷基氧基等。

[0630] 作为羰基(-C=O-R)的实例,列举甲酰基(-C=O-H)、烷基羰基、环烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、芳基羰基、杂芳基羰基、芳烷基羰基等。

[0631] 作为氧基羰基(-C=O-OR)的实例,列举烷基氧基羰基、环烷基氧基羰基、烯基氧基羰基、炔基氧基羰基、芳基氧基羰基、杂芳基氧基羰基、芳烷基氧基羰基等。

[0632] 作为羰基氧基 ($-O-C=O-R$) 的实例,列举烷基羰基氧基、环烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、芳基羰基氧基、杂芳基羰基氧基、芳烷基羰基氧基等。

[0633] 作为硫代羰基 ($-C=O-SR$) 的实例,列举烷基硫代羰基、环烷基硫代羰基、烯基硫代羰基、炔基硫代羰基、芳基硫代羰基、杂芳基硫代羰基、芳烷基硫代羰基等。

[0634] 作为羰基硫代 ($-S-C=O-R$) 的实例,列举烷基羰基硫代、环烷基羰基硫代、烯基羰基硫代、炔基羰基硫代、芳基羰基硫代、杂芳基羰基硫代、芳烷基羰基硫代等。

[0635] 作为氨基羰基 ($-C=O-NHR$) 的实例,列举烷基氨基羰基、环烷基氨基羰基、烯基氨基羰基、炔基氨基羰基、芳基氨基羰基、杂芳基氨基羰基、芳烷基氨基羰基等。进一步,与 $-C=O-NHR$ 中的 N 原子结合的 H 原子任选被选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基的取代基取代。

[0636] 作为羰基氨基 ($-NH-C=O-R$) 的实例,列举烷基羰基氨基、环烷基羰基氨基、烯基羰基氨基、炔基羰基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基、芳烷基羰基氨基等。进一步,与 $-NH-C=O-R$ 中的 N 原子结合的 H 原子任选被选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基的取代基取代。

[0637] 作为氧基羰基氨基 ($-NH-C=O-OR$) 的实例,列举烷氧基羰基氨基、环烷氧基羰基氨基、烯基氧基羰基氨基、炔基氧基羰基氨基、芳基氧基羰基氨基、杂芳基氧基羰基氨基、芳烷基氧基羰基氨基等。进一步,与 $-NH-C=O-OR$ 中的 N 原子结合的 H 原子任选被选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基的取代基取代。

[0638] 作为磺酰基氨基 ($-NH-SO_2-R$) 的实例,列举烷基磺酰基氨基、环烷基磺酰基氨基、烯基磺酰基氨基、炔基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、杂芳基磺酰基氨基、芳烷基磺酰基氨基等。进一步,与 $-NH-SO_2-R$ 中的 N 原子结合的 H 原子任选被选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基的取代基取代。

[0639] 作为氨基磺酰基 ($-SO_2-NHR$) 的实例,列举烷基氨基磺酰基、环烷基氨基磺酰基、烯基氨基磺酰基、炔基氨基磺酰基、芳基氨基磺酰基、杂芳基氨基磺酰基、芳烷基氨基磺酰基等。进一步,与 $-SO_2-NHR$ 中的 N 原子结合的 H 原子任选被选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基的取代基取代。

[0640] 作为氨磺酰氨基 ($-NH-SO_2-NHR$) 的实例,列举烷基氨磺酰氨基、环烷基氨磺酰氨基、烯基氨磺酰氨基、炔基氨磺酰氨基、芳基氨磺酰氨基、杂芳基氨磺酰氨基、芳烷基氨磺酰氨基等。进一步,与 $-NH-SO_2-NHR$ 中的 N 原子结合的 2 个 H 原子中的至少 1 个任选被选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基的取代基取代。在 2 个 H 原子共同被取代的情形中,可以分别独立地选择取代基,此外,这 2 个取代基可以形成环。

[0641] 作为含有 S 原子的取代基的实例,列举硫醇 ($-SH$)、硫代 ($-S-R$)、亚磺酰基 ($-S=O-R$)、磺酰基 ($-S(O)_2-R$)、磺基 ($-SO_3H$) 等。

[0642] 作为硫代 ($-S-R$) 的实例,列举烷基硫代、环烷基硫代、烯基硫代、炔基硫代、芳基硫代、杂芳基硫代、芳烷基硫代等。

[0643] 作为亚磺酰基 ($-S=O-R$) 的实例,列举烷基亚磺酰基、环烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基、芳烷基亚磺酰基等。

[0644] 作为磺酰基 ($-S(O)_2-R$) 的实例,列举烷基磺酰基、环烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、芳烷基磺酰基等。

[0645] 作为包含N原子的取代基的实例,列举叠氮(-N₃)、氰基(-CN)、伯氨基(-NH₂)、仲氨基(-NH-R)、叔氨基(-NR(R'))、脒基(-C(=NH)-NH₂)、取代脒基(-C(=NR)-NR'R'')、胍基(-NH-C(=NH)-NH₂)、取代胍基(-NR-C(=NR'')-NR'R'')、氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R'')等。

[0646] 作为仲氨基(-NH-R)的实例,列举烷基氨基、环烷基氨基、烯基氨基、炔基氨基、芳基氨基、杂芳基氨基、芳烷基氨基等。

[0647] 叔氨基(-NR(R'))中N原子上的2个取代基R和R'可以分别独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基。作为叔氨基的实例,列举例如烷基(芳烷基)氨基等。这2个取代基可以形成环。

[0648] 取代脒基(-C(=NR)-NR'R'')中N原子上的3个取代基R、R'、和R''可以分别独立地选自氢原子、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基。作为取代脒基的实例,列举例如烷基(芳烷基)(芳基)脒基等。这些取代基可相互形成环。

[0649] 取代胍基(-NR-C(=NR'')-NR'R'')中N原子上的4个取代基R、R'、R''、和R'''可以分别独立地选自氢原子、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基。这些取代基可相互形成环。

[0650] 氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R'')中N原子上的3个取代基R、R'、和R''可以分别独立地选自氢原子、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基。这些取代基可相互形成环。

[0651] 作为包含B原子的取代基的实例,列举硼基(-BR(R'))和二氧基硼基(-B(OR)(OR'))等。B原子上的2个取代基R和R'可以分别独立地选自氢原子、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和芳烷基。这些取代基可以相互形成环。

[0652] 在几个方式中,作为本公开中的氨基酸,可以示例nBuG(2-(丁基氨基)乙酸)、Pic2((2S)-吡啶-2-甲酸)、dA((2R)-2-氨基丙酸)、MeA3Pyr((2S)-2-(甲基氨基)-3-(3-吡啶基)丙酸)、StBuOH((2S)-3-(2-羟基-2-甲基-丙氧基)-2-(甲基氨基)丙酸)、MeSnPr((2S)-2-(甲基氨基)-3-丙氧基-丙酸)、SPh2Cl1((2S)-2-氨基-3-(2-氯苯氧基)丙酸)、MeHph((2S)-2-(甲基氨基)-4-苯基-丁酸)、和Ile等。

[0653] 作为本公开中的氨基酸类似物的实例,列举例如羟基羧酸(羟基酸)。羟基羧酸中包含α-羟基羧酸、β-羟基羧酸、γ-羟基羧酸等。羟基羧酸中α位的碳与氨基酸同样地可以结合氢原子以外的侧链。作为立体结构,可包含L型和D型的任一种。侧链的结构可以与上述天然氨基酸或非天然氨基酸的侧链同样地定义。作为羟基羧酸的实例,可以列举羟基乙酸、乳酸、苯基乳酸等。

[0654] 本公开中的氨基酸可以是可翻译的氨基酸,氨基酸类似物可以是可翻译的氨基酸类似物。本说明书中“可翻译的”氨基酸或氨基酸类似物(有时统称为氨基酸等)意味着可通过翻译合成(例如,应用本公开中记载的翻译系统)掺入肽的氨基酸等。某氨基酸等是否可翻译可以通过应用结合了该氨基酸等的tRNA的翻译合成实验确认。翻译合成实验中可以应用重构的无细胞翻译系统(例如,参考W02013100132)。

[0655] 本公开中的非天然氨基酸和氨基酸类似物可以通过以往公知的化学合成法、和后续实施例中记载的合成法、基于它们的合成法配制。

[0656] 在几个方式中,本公开的tRNA可以区别读出由M₁M₂A表示的密码子和由M₁M₂G表示的密码子,翻译关于这些密码子各自的不同的氨基酸或氨基酸类似物。在几个方式中,本公开的tRNA可以区别读出由M₁M₂U表示的密码子、由M₁M₂A表示的密码子和由M₁M₂G表示的密码

子,翻译关于这些密码子各自的不同的氨基酸或氨基酸类似物。在几个方式中,本公开的tRNA可以区别读出由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子,翻译关于这些密码子各自的不同的氨基酸或氨基酸类似物。此处,密码子的第1个字母的核苷(M_1)和第2个字母的核苷(M_2)分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。在另一方式中,本公开的tRNA具有与由 M_1M_2A 表示的特定的密码子、由 M_1M_2G 表示的特定的密码子互补的反密码子。在又一方式中,本公开的tRNA具有与由 M_1M_2U 表示的特定的密码子、由 M_1M_2A 表示的特定的密码子、由 M_1M_2G 表示的特定的密码子互补的反密码子。在又一方式中,本公开的tRNA具有与由 M_1M_2C 表示的特定的密码子、由 M_1M_2A 表示的特定的密码子、由 M_1M_2G 表示的特定的密码子互补的反密码子。在进一步的方式中,tRNA中反密码子的第3个字母的核苷(N_3)和第2个字母的核苷(N_2)可以选择为与 M_1 和 M_2 分别互补的核苷, N_2 和 N_3 可分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。具体地, M_2 (或 M_1)是腺苷时, N_2 (或 N_3)是尿苷。 M_2 (或 M_1)是鸟苷时, N_2 (或 N_3)是胞苷。 M_2 (或 M_1)是胞苷时, N_2 (或 N_3)是鸟苷。 M_2 (或 M_1)是尿苷时, N_2 (或 N_3)是腺苷。

[0657] 在本公开的上下文中,“某tRNA可翻译特定的密码子”的方式本质上包括“某tRNA具有与特定的密码子互补的反密码子”的方式,只要提及该tRNA上的反密码子的序列,这些表述就可互换。

[0658] 构成本公开中的翻译系统的tRNA可翻译的密码子的第1个字母的核苷(M_1)和第2个字母的核苷(M_2)可以分别选自遗传密码表中构成特定的密码子框的密码子的第1个字母的核苷(M_1)和第2个字母的核苷(M_2)。在特定的方式中,遗传密码表是标准遗传密码表。在另一方式中,遗传密码表是天然的遗传密码表。

[0659] 在另一方式中,本公开中的 M_1 和 M_2 可以选自向天然遗传密码表中由 M_1M_2A 表示的密码子分配终止密码子、并且向由 M_1M_2G 表示的密码子分配氨基酸的密码子框。在另一方式中,本公开中的 M_1 和 M_2 可以选自向天然遗传密码表中由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子共同分配终止密码子的密码子框。

[0660] 在几个方式中,遗传密码表与天然遗传密码表相同的翻译系统从本公开中的翻译系统排除。在几个方式中,遗传密码表与表1中记载的遗传密码表相同的翻译系统从本公开中的翻译系统排除。

[0661] 在一个方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成第3个字母是A的密码子和是G的密码子共同编码相同的氨基酸的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。作为一个实例,在密码子由 UUM_3 表示的密码子框中,由于第3个字母是A的密码子(UUA)和是G的密码子(UUG)共同编码相同的氨基酸(Leu),构成同一密码子框的密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(U)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0662] 在一个方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成第3个字母是U的密码子和是A的密码子共同编码相同的氨基酸的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。作为一个实例,在密码子由 AUM_3 表示的密码子框中,由于第3个字母是U的密码子(AUU)和是A的密码子(AUA)共同编码相同的氨基酸(Ile),构成同一密码子框的密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(U)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0663] 在一个方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成第3个字母是A的密码子和是G的密码子编码相互不同的氨基酸的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。作为一个实例,在密码子由 AUM_3 表示的密

码子框中,由于第3个字母是A的密码子(AUA)和是G的密码子(AUG)编码相互不同的氨基酸(Ile和Met),构成同一密码子框的密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(U)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0664] 在一个方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成第3个字母是A的密码子和/或是G的密码子是终止密码子的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。作为一个实例,在密码子由 UGM_3 表示的密码子框中,由于第3个字母是A的密码子(UGA)是终止密码子(蛋白石),构成同一密码子框的密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(G)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0665] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 UUM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(U)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0666] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 UAM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(A)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0667] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 UGM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(G)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0668] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 CAM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(C)和第2个字母的核苷(A)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0669] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 CGM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(C)和第2个字母的核苷(G)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0670] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 AUM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(U)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0671] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 ACM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(C)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0672] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 AAM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(A)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0673] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 AGM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(G)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0674] 在进一步的方式中, M_1 和 M_2 可分别选自构成密码子由 GAM_3 表示的密码子框的密码子的 M_1 和 M_2 。具体地,该密码子中第1个字母的核苷(G)和第2个字母的核苷(A)可以分别选择为 M_1 和 M_2 。

[0675] 本公开的tRNA中反密码子的第3个字母的核苷(N_3)和第2个字母的核苷(N_2)可以选择为与 M_1 和 M_2 分别互补的核苷。

[0676] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 UUM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(U)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择A作为 N_3 ,A作为 N_2 。

[0677] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 UAM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(A)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择A作为 N_3 ,U作为 N_2 。

[0678] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 UGM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(U)和第2个字母的核苷(G)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择A作为 N_3 ,C作为 N_2 。

[0679] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 CAM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(C)和第2个字母的核苷(A)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择G作为 N_3 ,U作为 N_2 。

[0680] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 CGM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(C)和第2个字母的核苷(G)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择G作为 N_3 ,C作为 N_2 。

[0681] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 AUM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(U)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择U作为 N_3 ,A作为 N_2 。

[0682] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 ACM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(C)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择U作为 N_3 ,G作为 N_2 。

[0683] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 AAM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(A)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择U作为 N_3 ,U作为 N_2 。

[0684] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 AGM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(A)和第2个字母的核苷(G)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择U作为 N_3 ,C作为 N_2 。

[0685] 在一个方式中, N_3 和 N_2 可选择为与构成密码子由 GAM_3 表示的密码子框的密码子中第1个字母的核苷(G)和第2个字母的核苷(A)分别互补的核苷。具体地,可以分别选择C作为 N_3 ,U作为 N_2 。

[0686] 在几个方式中,本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2A 表示的密码子。其它密码子可以是与由 M_1M_2A 表示的密码子不同的密码子,例如由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、或 M_1M_2G 表示的密码子的任一种。在特定的方式中,本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、和 M_1M_2G 表示的任一种密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2A 表示的密码子。

[0687] 在本公开的一个方式中,某tRNA可以选择性翻译 M_1M_2A 的密码子意味着(通过该tRNA的 M_1M_2A 的密码子的翻译量)比(通过该tRNA的其它密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以

上。作为一个实例,某tRNA是否可以选择性翻译由CUA表示的密码子可以通过(通过该tRNA的CUA的密码子的翻译量)是否比(通过该tRNA的CUG的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0688] 比较某特定的密码子(例如 M_1M_2A)翻译的量和其以外的密码子(例如 M_1M_2G)翻译的量时,例如,可以如下进行,准备作为编码某肽的mRNA的、包含 M_1M_2A 的密码子的mRNA,和具有除 M_1M_2A 的密码子置换为 M_1M_2G 的密码子以外全部与前述mRNA相同的核酸序列的另一mRNA,在相同条件下翻译这2个mRNA,比较其结果得到的2个肽的合成量。

[0689] 在另一方式中,由 M_1M_2A 表示的密码子与其它tRNA相比可通过本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。其它tRNA可以是具有与由 M_1M_2A 表示的密码子不同的密码子互补的反密码子的tRNA,例如具有与 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、或 M_1M_2G 的任一种密码子互补的反密码子的tRNA。在特定的方式中,由 M_1M_2A 表示的密码子与具有与 M_1M_2U 的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与 M_1M_2C 的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与 M_1M_2G 的密码子互补的反密码子的tRNA的任一种tRNA相比可通过本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。

[0690] 在本公开的一个方式中,由 M_1M_2A 表示的密码子可通过某tRNA选择性翻译意味着(通过该tRNA的 M_1M_2A 的密码子的翻译量)比(通过其它tRNA的 M_1M_2A 的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上。作为一个实例,由CUA表示的密码子是否可通过某tRNA选择性翻译可以通过(通过该tRNA的CUA的密码子的翻译量)是否比(通过具有与CUG的密码子互补的反密码子的tRNA(例如具有CAG的反密码子的tRNA)的CUA的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0691] 本公开的翻译系统可以联合具有前述2个特征。即,在特定的方式中,在本公开的翻译系统中,(i)具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2A 表示的密码子,并且(ii)由 M_1M_2A 表示的密码子与其它tRNA相比可通过具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。在这样的关系成立的情形中,在本公开的翻译系统中,应用具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的肽翻译与应用其以外的tRNA的肽翻译可以称为不引起彼此相互作用的独立关系,即具有正交性(正交的)关系。在天然存在的生物的翻译系统中,由于本来密码子和氨基酸之间确立了严格的对应关系,通过向其加入无正交性tRNA,该对应关系破坏,恐怕对翻译系统的功能产生致命影响。因此,在本公开的翻译系统中,具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA及其以外的tRNA之间确立正交性可为重要的特征之一。

[0692] 在一个方式中,本公开中的翻译系统包含:(a)具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和(b)具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的至少2个tRNA。本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA和具有与由 M_1M_2G 表示

的密码子互补的反密码子的tRNA的反密码子以外的核酸序列可以共同是相同的,也可以相互不同。在反密码子以外的核酸序列相同的情形中,由于这2个tRNA的物理化学性质可为相互类似的,具有可以构建反应性更均匀、稳定的翻译系统的可能性。

[0693] 在几个方式中,本公开中具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2G 表示的密码子。其它密码子可以是与由 M_1M_2G 表示的密码子不同的密码子,例如由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、或 M_1M_2A 表示的密码子的任一种。在特定的方式中,本公开中具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、和 M_1M_2A 表示的任一种密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2G 表示的密码子。

[0694] 在本公开的一个方式中,某tRNA可以选择性翻译 M_1M_2G 的密码子意味着(通过该tRNA的 M_1M_2G 的密码子的翻译量)比(通过该tRNA的其它密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上。作为一个实例,某tRNA是否可以选择性翻译由CUG表示的密码子可以通过(通过该tRNA的CUG的密码子的翻译量)是否比(通过该tRNA的CUA的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0695] 在另一方式中,由 M_1M_2G 表示的密码子与其它tRNA相比可通过本公开中具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。其它tRNA可以是具有与由 M_1M_2G 表示的密码子不同的密码子互补的反密码子的tRNA,例如具有与 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、或 M_1M_2A 的任一种密码子互补的反密码子的tRNA。在特定的方式中,由 M_1M_2G 表示的密码子与具有与 M_1M_2U 的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与 M_1M_2C 的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与 M_1M_2A 的密码子互补的反密码子的tRNA的任一种tRNA相比,可通过本公开中具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。

[0696] 在本公开的一个方式中,由 M_1M_2G 表示的密码子可通过某tRNA选择性翻译意味着(通过该tRNA的 M_1M_2G 的密码子的翻译量)比(通过其它tRNA的 M_1M_2G 的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上。作为一个实例,由CUG表示的密码子是否可通过某tRNA选择性翻译可以通过(通过该tRNA的CUG的密码子的翻译量)是否比(通过具有与CUA的密码子互补的反密码子的tRNA(例如具有UAG的反密码子的tRNA)的CUG的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0697] 本公开的翻译系统可以联合具有前述2个特征。即,在特定的方式中,在本公开的翻译系统中,(i) 具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2G 表示的密码子,并且(ii) 由 M_1M_2G 表示的密码子与其它tRNA相比可通过具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。在这样的关系成立的情形中,在本公开的翻译系统中,应用具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的

肽翻译与应用其以外的tRNA的肽翻译可以称为不引起彼此相互作用的独立关系,即具有正交性(正交的)关系。在本公开的翻译系统中,具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA及其以外的tRNA之间确立正交性可为重要的特征之一。

[0698] 在进一步的方式中,本公开中与具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(以后,也将本氨基酸表述为“氨基酸-A”)和与具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(以后,也将本氨基酸表述为“氨基酸-G”)的氨基酸种类相互不同。关于本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,在如上述的正交的关系成立的情形中,在本翻译系统中, M_1M_2A 的密码子和氨基酸-A、以及 M_1M_2G 的密码子和氨基酸-G的任一种都是一一对应关系。即,在本公开的翻译系统中,从相同的密码子框内存在的(i) M_1M_2A 和(ii) M_1M_2G 的2个密码子可翻译2种不同的氨基酸。

[0699] 在一个方式中,本公开中的翻译系统包含(a)具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、(b)具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和(c)具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的至少3个tRNA。本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的反密码子以外的核酸序列可以全部相同,也可以相互不同。在反密码子以外的核酸序列相同的情形中,由于这3个tRNA的物理化学性质可为相互类似的,具有可以构建反应性更均匀、稳定的翻译系统的可能性。

[0700] 在几个方式中,本公开中具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2U 表示的密码子。其它密码子可以是与由 M_1M_2U 表示的密码子不同的密码子,例如由 M_1M_2A 或 M_1M_2G 表示的密码子的任一种。在特定的方式中,本公开中具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与由 M_1M_2A 和 M_1M_2G 表示的任一种密码子相比,可以选择性翻译由 M_1M_2U 表示的密码子。

[0701] 在本公开的一个方式中,某tRNA可以选择性翻译 M_1M_2U 的密码子意味着(通过该tRNA的 M_1M_2U 的密码子的翻译量)比(通过该tRNA的其它密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上。作为一个实例,某tRNA是否可以选择性翻译由CUU表示的密码子可以通过(通过该tRNA的CUU的密码子的翻译量)是否比(通过该tRNA的CUA的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0702] 在另一方式中,由 M_1M_2U 表示的密码子与其它tRNA相比可通过本公开中具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。其它tRNA可以是具有与由 M_1M_2U 表示的密码子不同的密码子互补的反密码子的tRNA,例如具有与 M_1M_2A 或 M_1M_2G 的任一种密码子互补的反密码子的tRNA。在特定的方式中,由 M_1M_2U 表示的密码子与具有与 M_1M_2A 的密码子互补的反密码子的tRNA和具有与 M_1M_2G 的密码子互补的反密码子的tRNA的任一种tRNA相比,可通过本公开中具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。

[0703] 在本公开的一个方式中,由 M_1M_2U 表示的密码子可通过某tRNA选择性翻译意味着

(通过该tRNA的 M_1M_2U 的密码子的翻译量)比(通过其它tRNA的 M_1M_2U 的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上。作为一个实例,由CUU表示的密码子是否可通过某tRNA选择性翻译可以通过(通过该tRNA的CUU的密码子的翻译量)是否比(通过具有与CUA的密码子互补的反密码子的tRNA(例如具有UAG的反密码子的tRNA)的CUU的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0704] 本公开的翻译系统可以联合具有前述2个特征。即,在特定的方式中,在本公开的翻译系统中,(i)具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2U 表示的密码子,并且(ii)由 M_1M_2U 表示的密码子与其它tRNA相比可通过具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。在这样的关系成立的情形中,在本公开的翻译系统中,应用具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的肽翻译和应用其以外的tRNA的肽翻译可以称为不引起彼此相互作用的独立关系,即具有正交性(正交的)关系。在本公开的翻译系统中,具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA及其以外的tRNA之间确立正交性可为重要的特征之一。

[0705] 在进一步的方式中,本公开中与具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(“氨基酸-A”)、与具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(“氨基酸-G”)、和与具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(以后,也将本氨基酸表述为“氨基酸-U”)的氨基酸的种类的任一种都相互不同。关于本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,在如上述正交的关系成立的情形中,在本翻译系统中, M_1M_2A 的密码子和氨基酸-A、 M_1M_2G 的密码子和氨基酸-G、以及 M_1M_2U 的密码子和氨基酸-U的任一种都是一一对应关系。即,在本公开的翻译系统中,从相同的密码子框内存在的(i) M_1M_2A 、(ii) M_1M_2G 、和(iii) M_1M_2U 的3个密码子,能够翻译3种不同的氨基酸。或者,在本公开的翻译系统中,从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框,能够翻译3种不同的氨基酸。

[0706] 在一个方式中,本公开中的翻译系统包含(a)具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、(b)具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和(c)具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的至少3个tRNA。本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的反密码子以外的核酸序列可以全部相同,也可以相互不同。在反密码子以外的核酸序列相同的情形中,由于这3个tRNA的物理化学性质可为相互类似的,具有可以构建反应性更均匀、稳定的翻译系统的可能性。

[0707] 在几个方式中,本公开中具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2C 表示的密码子。其它密码子可以是与由 M_1M_2C 表示的密码子不同的密码子,例如由 M_1M_2A 或 M_1M_2G 表示的密码子的任一种。在特定的方式中,本公开中具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与由 M_1M_2A 和 M_1M_2G 表示的任一种密

码子相比,可以选择性翻译由 M_1M_2C 表示的密码子。

[0708] 在本公开的一个方式中,某tRNA可以选择性翻译 M_1M_2C 的密码子意味着(通过该tRNA的 M_1M_2C 的密码子的翻译量)比(通过该tRNA的其它密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上。作为一个实例,某tRNA是否可以选择性翻译由CUC表示的密码子可以通过(通过该tRNA的CUC的密码子的翻译量)是否比(通过该tRNA的CUA的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0709] 在另一方式中,由 M_1M_2C 表示的密码子与其它tRNA相比可通过本公开中具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。其它tRNA可以是具有与由 M_1M_2C 表示的密码子不同的密码子互补的反密码子的tRNA,例如具有与 M_1M_2A 或 M_1M_2G 的任一种密码子互补的反密码子的tRNA。在特定的方式中,由 M_1M_2C 表示的密码子与具有与 M_1M_2A 的密码子互补的反密码子的tRNA和具有与 M_1M_2G 的密码子互补的反密码子的tRNA的任一种tRNA相比,可通过本公开中具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。

[0710] 在本公开的一个方式中,由 M_1M_2C 表示的密码子可通过某tRNA选择性翻译意味着(通过该tRNA的 M_1M_2C 的密码子的翻译量)比(通过其它tRNA的 M_1M_2C 的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上。作为一个实例,由CUC表示的密码子是否通过某tRNA选择性翻译可以通过(通过该tRNA的CUC的密码子的翻译量)是否比(通过具有与CUA的密码子互补的反密码子的tRNA(例如具有UAG的反密码子的tRNA)的CUC的密码子的翻译量)多例如2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、或100倍以上而判断。

[0711] 本公开的翻译系统可以联合具有前述2个特征。即,在特定的方式中,在本公开的翻译系统中,(i) 具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA与其它密码子相比可以选择性翻译由 M_1M_2C 表示的密码子,并且(ii) 由 M_1M_2C 表示的密码子与其它tRNA相比可通过具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA选择性翻译。在这样的关系成立的情形中,在本公开的翻译系统中,应用具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的肽翻译和应用其以外的tRNA的肽翻译可以称为不引起彼此相互作用的独立关系,即具有正交性(正交的)关系。在本公开的翻译系统中,具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA及其以外的tRNA之间确立正交性可为重要的特征之一。

[0712] 在进一步的方式中,本公开中与具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(“氨基酸-A”)、与具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(“氨基酸-G”)、和与具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA结合的氨基酸(以后,也将本氨基酸表述为“氨基酸-C”)的氨基酸的种类的任一种都相互不同。关于本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2G 表示的密

码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA,在如上述正交的关系成立的情形中,在本翻译系统中, M_1M_2A 的密码子和氨基酸-A、 M_1M_2G 的密码子和氨基酸-G、以及 M_1M_2C 的密码子和氨基酸-C的任一种都是一一对应关系。即,在本公开的翻译系统中,从相同的密码子框内存在的(i) M_1M_2A 、(ii) M_1M_2G 、和(iii) M_1M_2C 的3个密码子,能够翻译3种不同的氨基酸。或者,在本公开的翻译系统中,从由 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、和 M_1M_2G 构成的密码子框,能够翻译3种不同的氨基酸。

[0713] 在几个方式中,本公开中具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA中,非天然氨基酸可以与至少一个结合。

[0714] 在几个方式中,可以向遗传密码表中构成至少1个密码子框的密码子分配本公开的tRNA。在进一步的方式中,可以向遗传密码表中构成多个密码子框的密码子分配本公开的tRNA。作为多个密码子框,可以是例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、或16个密码子框。各自的tRNA向构成哪一密码子框的密码子分配通过该tRNA具有的反密码子的第2个字母的核苷(N_2)和第3个字母的核苷(N_3)确定。只要是向构成不同密码子框的密码子分配的彼此的tRNA,则具有相互不同的 N_2 和 N_3 。此外,向构成不同密码子框的密码子分配的彼此的tRNA的反密码子以外的核酸序列可以相同,也可以相互不同。在反密码子以外的核酸序列相同的情形中,由于这些tRNA的物理化学性质可为相互类似的,具有可以构建反应性更均匀、稳定的翻译系统的可能性。

[0715] 在特定的方式中,可以向遗传密码表中构成选自以下(i)~(x)的至少1个密码子框的密码子分配本公开的tRNA。在进一步的方式中,可以向遗传密码表中构成选自以下(i)~(x)的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个的密码子框的密码子分配本公开的tRNA。

[0716] (i) 密码子由 UUM_3 表示的密码子框、

[0717] (ii) 密码子由 UAM_3 表示的密码子框、

[0718] (iii) 密码子由 UGM_3 表示的密码子框、

[0719] (iv) 密码子由 CAM_3 表示的密码子框、

[0720] (v) 密码子由 CGM_3 表示的密码子框、

[0721] (vi) 密码子由 AUM_3 表示的密码子框、

[0722] (vii) 密码子由 ACM_3 表示的密码子框、

[0723] (viii) 密码子由 AAM_3 表示的密码子框、

[0724] (ix) 密码子由 AGM_3 表示的密码子框、

[0725] (x) 密码子由 GAM_3 表示的密码子框。

[0726] 在特定的方式中,可以向遗传密码表中构成选自以下(i)~(vii)的至少1个密码子框的密码子分配本公开的tRNA。在进一步的方式中,可以向遗传密码表中构成选自以下(i)~(vii)的至少2个、3个、4个、5个、6个、或7个的密码子框的密码子分配本公开的tRNA。

[0727] (i) 密码子由 UUM_3 表示的密码子框、

[0728] (ii) 密码子由 UGM_3 表示的密码子框、

[0729] (iii) 密码子由 CAM_3 表示的密码子框、

[0730] (iv) 密码子由 CGM_3 表示的密码子框、

[0731] (v) 密码子由 AAM_3 表示的密码子框、

[0732] (vi) 密码子由 AGM_3 表示的密码子框、

[0733] (vii) 密码子由 GAM_3 表示的密码子框。

[0734] 在几个方式中,可以对未分配本公开的tRNA的构成残留密码子框的密码子分配任意tRNA。期望地,对构成残留密码子框的密码子分配可将各密码子翻译为某些氨基酸的任意tRNA的组。这样的tRNA的组可以来自天然tRNA,也可以是人工合成的tRNA。

[0735] 在几个方式中,可以从本公开的翻译系统翻译1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、或20种氨基酸或氨基酸类似物。或者,如果应用本公开的tRNA进行1个密码子框中 $\text{M}_1\text{M}_2\text{A}$ 和 $\text{M}_1\text{M}_2\text{G}$ 的密码子、 $\text{M}_1\text{M}_2\text{U}$ 、 $\text{M}_1\text{M}_2\text{A}$ 和 $\text{M}_1\text{M}_2\text{G}$ 的密码子、或 $\text{M}_1\text{M}_2\text{C}$ 、 $\text{M}_1\text{M}_2\text{A}$ 和 $\text{M}_1\text{M}_2\text{G}$ 的密码子的区别读出,也可翻译多于20种的氨基酸或氨基酸类似物。在进一步的方式中,可以从本公开的翻译系统翻译例如21种、22种、23种、24种、25种、26种、27种、28种、29种、30种、31种、32种、33种、34种、35种、36种、37种、38种、39种、40种、41种、42种、43种、44种、45种、46种、47种、或48种氨基酸或氨基酸类似物。

[0736] 在几个方式中,本公开的翻译系统是无细胞翻译系统。在进一步的方式中,本公开的翻译系统是重构型的无细胞翻译系统。无细胞翻译系统中的细胞提取液和肽翻译的必需因子(例如核糖体等)可以利用来自各种生物材料的那种。作为这样的生物材料,可以列举例如大肠杆菌、酵母、小麦胚芽、兔网织红细胞、HeLa细胞、或昆虫细胞等。在几个方式中,本公开的无细胞翻译系统包含来自大肠杆菌的核糖体。

[0737] 在几个方式中,对于本公开的翻译系统,可以以可通过选自 $0.8\mu\text{M}$ 、 $1.6\mu\text{M}$ 、 $2.4\mu\text{M}$ 、 $3.2\mu\text{M}$ 、 $4.0\mu\text{M}$ 、 $4.8\mu\text{M}$ 、 $5.6\mu\text{M}$ 、 $6.4\mu\text{M}$ 和 $10\mu\text{M}$ 的下限、和选自 $100\mu\text{M}$ 、 $150\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $250\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ 、 $350\mu\text{M}$ 、 $400\mu\text{M}$ 、 $450\mu\text{M}$ 、 $500\mu\text{M}$ 、 $550\mu\text{M}$ 、 $600\mu\text{M}$ 、 $650\mu\text{M}$ 、 $700\mu\text{M}$ 、 $750\mu\text{M}$ 、 $800\mu\text{M}$ 、 $850\mu\text{M}$ 、 $900\mu\text{M}$ 、 $950\mu\text{M}$ 、 $1000\mu\text{M}$ 的上限指定的范围的浓度包含每一密码子的tRNA(与各密码子对应的tRNA)。具体地,例如,可以以 $0.8\sim 1000\mu\text{M}$ 、优选 $1.6\sim 500\mu\text{M}$ 、更优选 $3.2\sim 250\mu\text{M}$ 、进一步优选 $6.4\sim 150\mu\text{M}$ 、特别优选 $10\sim 100\mu\text{M}$ 的浓度包含。

[0738] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为尿苷(U), M_2 为尿苷(U)的密码子。即,可以向密码子由 UUM_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从UUA和UUG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从UUU、UUA、UUG的密码子的组合、或UUC、UUA、UUG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。为了选择性翻译这些密码子,作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如 0.8

~1000 μ M的范围内。

[0739] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为尿苷(U)、 M_2 为腺苷(A)的密码子。即,可以向密码子由 UAM_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从UAA和UAG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从UAU、UAA、UAG的密码子的组合、或UAC、UAA、UAG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0740] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为尿苷(U)、 M_2 为鸟苷(G)的密码子。即,可以向密码子由 UGM_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从UGA和UGG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从UGU、UGA、UGG的密码子的组合、或UGC、UGA、UGG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0741] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为胞苷(C)、 M_2 为腺苷(A)的密码子。即,可以向密码子由 CAM_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从CAA和CAG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从CAU、CAA、CAG的密码子的组合、或CAC、CAA、CAG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,

优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0742] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为胞苷(C)、 M_2 为鸟苷(G)的密码子。即,可以向密码子由CG M_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从CGA和CGG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从CGU、CGA、CGG的密码子的组合、或CGC、CGA、CGG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0743] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为腺苷(A)、 M_2 为尿苷(U)的密码子。即,可以向密码子由AU M_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从AUA和AUG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从AUU、AUA、AUG的密码子的组合、或AUC、AUA、AUG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0744] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为腺苷(A)、 M_2 为胞苷(C)的密码子。即,可以向密码子由AC M_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从ACA和ACG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从ACU、ACA、ACG的密码子的组合、或ACC、ACA、ACG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也

包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0745] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为腺苷(A)、 M_2 为腺苷(A)的密码子。即,可以向密码子由 AAM_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从AAA和AAG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从AAU、AAA、AAG的密码子的组合、或AAC、AAA、AAG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0746] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为腺苷(A)、 M_2 为鸟苷(G)的密码子。即,可以向密码子由 AGM_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从AGA和AGG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从AGU、AGA、AGG的密码子的组合、或AGC、AGA、AGG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0747] 在特定的方式中,本公开的翻译系统中的密码子是 M_1 为鸟苷(G)、 M_2 为腺苷(A)的密码子。即,可以向密码子由 GAM_3 表示的密码子框分配本公开的tRNA。通过应用本公开中包含tRNA的翻译系统,可以从GAA和GAG的密码子的组合选择性翻译2种氨基酸。或者,可以从GAU、GAA、GAG的密码子的组合、或GAC、GAA、GAG的密码子的组合选择性翻译3种氨基酸。作为

本公开的tRNA,优选应用人工合成的tRNA(例如转录合成的tRNA)。该情形中,除应用天然tRNA的序列外,还可以在反密码子以外的部分应用来自任意tRNA(例如tRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)等)的序列、向其连接期望的反密码子的序列并应用。本公开的tRNA也包含反密码子的部分,优选仅由腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)4种核苷构成,期望不包含其以外的修饰核苷。作为本公开的翻译系统,优选无细胞翻译系统,特别是重构型的无细胞翻译系统。将各tRNA氨酰化时,优选使翻译系统外的氨基酸结合,作为用于其的方法,优选例如pCpA法、pdCpA法、应用人工RNA催化剂(flexizyme)的方法、或应用氨酰tRNA合成酶(ARS)的方法。作为与各tRNA结合的氨基酸,天然氨基酸、非天然氨基酸的任一都可以应用,从本公开的目的的观点看来,也期望应用天然遗传密码表中不包含的非天然氨基酸。翻译系统中包含的本公开的tRNA的每一密码子的浓度优选例如0.8~1000 μ M的范围内。

[0748] III. 肽的制备方法、组合物和试剂盒

[0749] 在一方面,本公开提供肽的制备方法,其包括应用本公开中的翻译系统翻译核酸。具体地,本公开涉及肽的制备方法,其包括在包含具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的翻译系统中翻译核酸。在一方面,在本公开中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。在一方面,前述2种tRNA的各自结合相互不同的氨基酸或氨基酸类似物。在又一方面,在本公开中的制备方法中,可从由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子翻译至少2种氨基酸或氨基酸类似物。

[0750] 在一方面,本公开涉及肽的制备方法,其包括在包含具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的翻译系统中翻译核酸。在又一方面,本公开涉及肽的制备方法,其包括在包含具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA的翻译系统中翻译核酸。在一方面,在本公开中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。在一方面,前述3种tRNA的各自结合相互不同的氨基酸或氨基酸类似物。在又一方面,在本公开中的制备方法中,可从由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子翻译至少3种氨基酸或氨基酸类似物。

[0751] 在本公开中的核酸中,可分别包含一个或多个由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子。本公开中的肽的制备方法可包括本公开中的tRNA将该核酸中可包含的由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子分别一次或多次、选择性翻译的过程(或区别读出过程)。在一个方式中,在本公开中的肽的制备方法中,能够翻译包含这些密码子的1种或多种的核酸。

[0752] 在本公开中的核酸中,可分别包含一个或多个由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子。本公开中的肽的制备方法可包括本公开中的tRNA将该核酸中可包含的由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子分别一次或多次、选择性翻译的过程(或区别读出过程)。在一个方式中,在本公开中的肽的制备方法中,能够翻译包含这些密码子的1种或多种的核酸。

[0753] 在本公开中的核酸中,可分别包含一个或多个由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子。本公开中的肽的制备方法可包括本公开中的tRNA将该核酸中可包含的由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子分别一次或多次、选择性翻译的过程(或区别读出过程)。在一个方式中,在本公开中的肽的制备方法中,能够翻译包含这些密码子的1种或多种的核酸。

[0754] 在本公开中的核酸中,可分别包含一个或多个由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子。本公开中的肽的制备方法可包括本公开中的tRNA将该核酸中可包含的由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子分别一次或多次、选择性翻译的过程(或区别读出过程)。在一个方式中,在本公开中的肽的制备方法中,能够翻译包含这些密码子的1种或多种的核酸。

[0755] 在一方面,本公开涉及用于制备肽的组合物和试剂盒,其包含具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA。在一方面,在本公开中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。在一方面,前述2种tRNA的各自结合相互不同的氨基酸或氨基酸类似物。在又一方面,通过使用本公开中的组合物和试剂盒,可从由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子翻译至少2种氨基酸或氨基酸类似物。

[0756] 在一方面,本公开涉及用于制备肽的组合物和试剂盒,其包含具有与由 M_1M_2U 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA。在又一方面,本公开涉及用于制备肽的组合物和试剂盒,其包含具有与由 M_1M_2C 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、具有与由 M_1M_2A 表示的密码子互补的反密码子的tRNA、和具有与由 M_1M_2G 表示的密码子互补的反密码子的tRNA。在一方面,在本公开中, M_1 和 M_2 分别表示密码子的第1个字母和第2个字母的核苷, M_1 和 M_2 分别独立地选自腺苷(A)、鸟苷(G)、胞苷(C)、尿苷(U)的任一种。在一方面,前述3种tRNA的各自结合相互不同的氨基酸或氨基酸类似物。在又一方面,在本公开中的制备方法中,可从由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子翻译至少3种氨基酸或氨基酸类似物。

[0757] 构成本公开中的翻译系统的tRNA可以构成包含核酸的翻译中通常应用的缓冲液和物质等的组合物。此外,构成本公开中的翻译系统的tRNA可以与肽的翻译中通常应用的各种物质等共同预先包装、作为试剂盒供应。此外,试剂盒中包含的各种物质可以相应于其使用方式呈粉末状或液体状。此外,可以将它们容纳在适当容器中,适时地使用。

[0758] 在本公开中,2个以上的氨基酸通过酰胺键结合的化合物可包含在本公开的肽中。此外,羧基酸等氨基酸类似物替代氨基酸通过酯键结合的化合物可包含在本公开的肽中。肽中包含的氨基酸或氨基酸类似物的数目只要是2个以上则没有特别限制,列举例如2个以上、3个以上、4个以上、5个以上、6个以上、7个以上、8个以上、9个以上、10个以上、11个以上等,此外,列举100个以下、80个以下、50个以下、30个以下、25个以下、20个以下、19个以下、18个以下、17个以下、16个以下、15个以下、14个以下、13个以下、12个以下等,或者,也可以从9个、10个、11个、12个中选择。

[0759] 在一方面,本公开中的组合物和试剂盒中可以包含核酸。在一个方式中,构成本公开中的组合物和试剂盒的核酸可以分别包含一个或多个由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子。在又一方面,构成本公开中的组合物和试剂盒的核酸可以分别包含一个或多个(i)由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子、或、(ii)由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子、和由 M_1M_2G 表示的密码子。在又一方面,构成本公开中的组合物和试剂盒的核酸可以分别包含一个或多个由 M_1M_2A 表示的密码子、由 M_1M_2G 表示的密码子、由 M_1M_2U 表示的密码子、和由 M_1M_2C 表示的密码子。在一个方式中,本公开中的组合物和试剂盒可以包含1种或多种这样的核酸。

[0760] 在一个方式中,本公开的肽可以包含N取代氨基酸,肽中包含的N取代氨基酸的数目可以是例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个等。此外,在另一方式中,本公开的肽可以包含未N取代的氨基酸,未N取代的氨基酸的数目可以是例如1个、2个、3个、4个等。在进一步的方式中,本公开的肽可以包含N取代氨基酸和未N取代的氨基酸两者。

[0761] 在几个方式中,本公开的肽可以是直链状的肽,也可以是具有环状部分的肽。具有环状部分的肽意味着,通过肽链上存在的某氨基酸或氨基酸类似物的主链或侧链与相同的肽链上存在的另一氨基酸或氨基酸类似物的主链或侧链结合,在分子内形成环状结构的肽。具有环状部分的肽可以仅由环状部分构成,也可以共同包含环状部分和直链部分。环状部分中包含的氨基酸或氨基酸类似物的数目可以是例如4个以上、5个以上、6个以上、7个以上、8个以上、9个以上等,此外,14个以下、13个以下、12个以下、11个以下等。或者,也可以从9个、10个、11个中选择。此外,直链部分中包含的氨基酸或氨基酸类似物的数目可以是例如0个以上,此外,8个以下、7个以下、6个以下、5个以下、4个以下等。或者,也可以从0个、1个、2个、3个中选择。

[0762] 作为用于形成环状部分的键,例如,可以利用由氨基和羧基形成的肽键。除此之外,也可以利用由适当官能团的组合形成的酰胺键、二硫键、醚键、硫醚键、酯键、硫酯键、碳-碳键、烷基键、烯基键、膦酸酯醚键、偶氮键、胺键、 $C=N-C$ 键、内酰胺桥、氨基甲酰基键、脲键、硫脲键、硫代酰胺键、亚磺酰基键、磺酰基键、三唑键、苯并噁唑键等。碳-碳键可以通过铃木(Suzuki)反应、赫克(Heck)反应、菌头(Sonogashira)反应等以过渡金属为催化剂的反应形成。在一个方式中,本公开的肽包含分子内可形成上述键的至少1组官能团。环状部分的形成可以在应用本公开的翻译系统制备直链状肽后、通过单独进行用于使上述官能团彼此结合的反应而进行。关于具有环状部分的肽的合成,也可以参考W02013/100132、W02012/026566、W02012/033154、W02012/074130、W02015/030014、W02018/052002、Comb Chem High Throughput Screen (2010) 13:75-87、Nat Chem Biol (2009) 5:502-507、Nat Chem Biol (2009) 5:888-90、Bioconjug Chem (2007) 18:469-476、ChemBioChem (2009) 10:787-798、Chem Commun (Carmb) (2011) 47:9946-9958等。

[0763] 在几个方式中,本公开的翻译系统中翻译的核酸是mRNA。mRNA中可以编码具有期望的氨基酸序列的肽。通过将mRNA添加至本公开的翻译系统,可以进行该mRNA向肽的翻译。另一方面,在用于将DNA转录为mRNA的RNA聚合酶在翻译系统中包含的情形中,通过将DNA添加至本公开的翻译系统,可以联合进行该DNA向mRNA的转录、和该mRNA向肽的翻译。mRNA可以至少包含由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子,由 M_1M_2U 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由 M_1M_2G 表示的密码子,或由 M_1M_2C 表示的密码子、由 M_1M_2A 表示的密码子和由

M_1M_2G 表示的密码子。

[0764] 翻译的肽的N末端通常存在作为起始氨基酸的蛋氨酸,但也报告了几个用于将蛋氨酸以外的氨基酸导入N末端的方法。可以将它们与本公开中的肽的制备方法组合应用。作为这样的方法,例如,列举应用以蛋氨酸以外的氨基酸氨酰化的起始tRNA、从期望氨基酸起始翻译核酸的方法(起始抑制)。特别地,作为可容许外来氨基酸的程度,由于翻译起始时比肽链延伸时更高,在N末端,即使与天然氨基酸结构大大不同的氨基酸也可以利用(Goto& Suga, J Am Chem Soc (2009) 131 (14):5040-5041)。作为其它方法,列举通过从翻译系统除去起始蛋氨酰tRNA,或通过将起始氨基酸置换为蛋氨酸以外的翻译效率低的氨基酸,从第2个以后的密码子起始翻译的方法(起始通读(Initiation read-through);起始密码子的跳过)。作为又一方法,还可以列举通过使肽去甲酰酶(peptide deformylase)和蛋氨酸氨基肽酶(Methionine aminopeptidase)等酶作用,消除肽的N末端的蛋氨酸的方法(Meinzel et al., Biochimie (1993) 75:1061-1075)。通过准备从蛋氨酸起始的肽文库,使上述酶与它们作用,可以配制N末端从随机氨基酸起始的肽文库。

[0765] 在另一方面,本公开提供通过本公开中的肽的制备方法制备的肽。对于通过本公开中的方法制备的肽,进一步进行化学修饰等得到的肽也另外包含在本公开提供的肽中。

[0766] 在一方面,本公开提供肽文库的制备方法,其包括应用本公开中的翻译系统翻译核酸文库。通过准备作为分别编码肽的核酸分子的、富含核酸序列多样性的多个核酸分子,将它们分别翻译为肽,可以制备富含氨基酸序列多样性的多个肽分子。文库的大小没有特别限定,例如,可以是 10^6 以上、 10^7 以上、 10^8 以上、 10^9 以上、 10^{10} 以上、 10^{11} 以上、 10^{12} 以上、 10^{13} 以上、 10^{14} 以上等。核酸可以是DNA,也可以是RNA。RNA通常是mRNA。DNA经由向mRNA的转录进行向肽的翻译。这样的核酸文库可以通过本领域技术人员公知的方法或基于其的方法配制。合成核酸文库时,通过在期望位置应用混合碱基,可以容易地配制富含核酸序列多样性的多个核酸分子。作为应用混合碱基的密码子的实例,可以列举例如NNN(此处,N表示A、T、G、C的4碱基的混合)和NNW(此处,W表示A、T的2碱基的混合)、NNM(此处,W表示A、C的2碱基的混合)、NNK(此处,K表示G、T的2碱基的混合)、NNS(此处,S表示C、G的2碱基的混合)等。或者,通过将密码子的第3个字母中应用的碱基限定为A、T、G、C中任1种,可合成仅编码一部分特定氨基酸的核酸文库。进一步,制备包含混合碱基的密码子时,通过将多个碱基以不同比率而不是等比率混合,也可任意调节从该密码子得到的氨基酸的出现频率。如果以如上述密码子为1单位(unit),准备多个不同种的密码子单位,以期望顺序连接它们,也可设计包含的氨基酸的出现位置和出现频率被控制的文库。

[0767] 在几个方式中,本公开中的肽文库是肽在核酸上展示的文库(核酸展示文库、或简单地展示文库)。展示文库是特征如下的文库,通过肽与编码其的核酸结合形成1个复合物,表型与基因型相对应。作为主要的展示文库的实例,可以列举用mRNA展示法(Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA (1997) 94:12297-12302)、体外病毒法(Nemoto et al., FEBS Lett (1997) 414:405-408)、cDNA展示法(Yamaguchi et al., Nucleic Acids Res (2009) 37:e108)、核糖体展示法(Mattheakis et al., Proc Natl Acad Sci USA (1994) 91:9022-9026)、共价展示法(Reiersen et al., Nucleic Acids Res (2005) 33:e10)、CIS展示法(Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA (2004) 101:2806-2810)等制备的文库。或者,应用体外区室化法(Tawfik and Griffiths, Nat Biotechnol (1998) 16:652-656)制备

的文库也可以列举为展示文库的一个方式。

[0768] 在另一方面,本公开提供通过本公开中的肽文库的制备方法制备的肽文库。

[0769] 在一方面,本公开提供对靶标分子具有结合活性的肽的鉴定方法,其包括使本公开中的肽文库与靶标分子接触。靶标分子没有特别限定,可以从例如低分子化合物、高分子化合物、核酸、肽、蛋白、糖、脂质中适当选择。靶标分子可以是细胞外存在的分子,也可以是细胞内存在的分子。或者可以是细胞膜中存在的分子,该情形中,细胞外结构域、跨膜结构域、细胞内结构域的任一种可以为靶标。在使肽文库与靶标分子接触的步骤中,通常,靶标分子固定于一些固相载体(例如微量滴定板或微珠等),其后,通过除去不与靶标分子结合的肽,仅回收与靶标分子结合的肽,可以选择性浓缩对靶标分子具有结合活性的肽(淘汰法)。在应用的肽文库是核酸展示文库的情形中,由于编码其遗传信息的核酸与回收的肽结合,通过分离和分析它们,可以容易地鉴定编码回收的肽的核酸序列和氨基酸序列。进一步,基于得到的核酸序列或氨基酸序列,通过化学合成或基因重组方法等,也可以单独制备鉴定的肽。

[0770] 在一方面,本公开提供包含肽和编码该肽的核酸的核酸-肽复合物,其具有以下特征:

[0771] (i) 在编码肽的核酸序列中,包含 M_1M_2A 和 M_1M_2G 的2个密码子,并且

[0772] (ii) 在肽的氨基酸序列中,与 M_1M_2A 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物与与 M_1M_2G 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物的种类相互不同。

[0773] 此处, M_1 和 M_2 分别表示某特定的密码子的第1个字母和第2个字母(但是, M_1 是A、并且 M_2 是U的密码子除外)。

[0774] 在进一步的方面,本公开提供包含肽和编码该肽的核酸的核酸-肽复合物,其具有以下特征:

[0775] (i) 在编码肽的核酸序列中,包含 M_1M_2U 、 M_1M_2A 和 M_1M_2G 的3个密码子,并且

[0776] (ii) 在肽的氨基酸序列中,与 M_1M_2U 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物、与 M_1M_2A 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物、和与 M_1M_2G 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物的种类的任一都相互不同。

[0777] 此处, M_1 和 M_2 分别表示某特定的密码子的第1个字母和第2个字母。

[0778] 在另一方面,本公开提供包含肽和编码该肽的核酸的核酸-肽复合物,其具有以下特征:

[0779] (i) 编码肽的核酸序列中,包含 M_1M_2C 、 M_1M_2A 和 M_1M_2G 的3个密码子,并且

[0780] (ii) 在肽的氨基酸序列中,与 M_1M_2C 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物、与 M_1M_2A 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物、和与 M_1M_2G 的密码子对应的氨基酸或氨基酸类似物的种类的任一都相互不同。

[0781] 此处, M_1 和 M_2 分别表示某特定的密码子的第1个字母和第2个字母。

[0782] 在几个方式中,上述核酸-肽复合物可作为构成肽文库(特别是核酸展示文库)的要素之一包含在其中。在一个方式中,本公开提供包含本公开中的核酸-肽复合物的文库(肽文库或核酸展示文库)。在特定的方式中,上述核酸-肽复合物和文库可应用本公开中的tRNA、或本公开中的翻译系统制备。

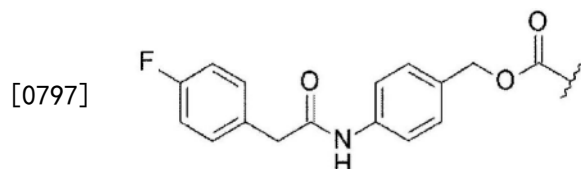
[0783] 另外,本说明书中引用的全部现有技术文献作为参考并入本说明书。

实施例

[0784] 本发明通过以下实施例进一步示例,但不限于下述实施例。

[0785] 另外,实施例中使用以下缩写。

- [0786] AA 乙酸铵
- [0787] CH_2CN 氰甲基
- [0788] DBU 1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯
- [0789] DCM 二氯甲烷
- [0790] DIC N,N-二异丙基碳二亚胺
- [0791] DIPEA N,N-二异丙基乙胺
- [0792] DMF 二甲基甲酰胺
- [0793] DMSO 二甲基亚砷
- [0794] FA 甲酸
- [0795] Fmoc 9-芴基甲氧羰基
- [0796] F-Pnaz 4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄氧基羰基:

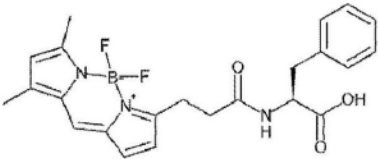
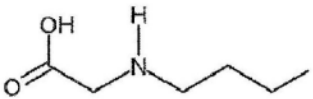
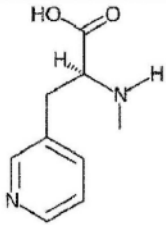
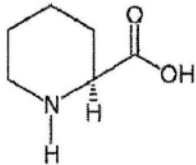
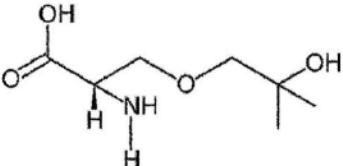
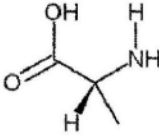
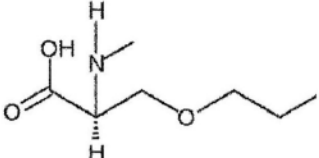
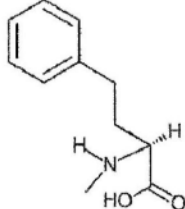
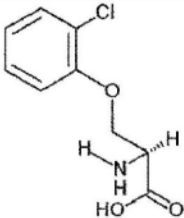
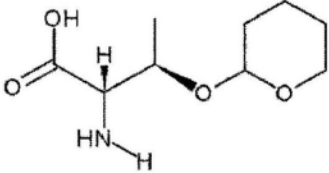


- [0798] HFIP 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇
- [0799] MeCN 乙腈
- [0800] NMP N-甲基-2-吡咯烷酮
- [0801] TEA 三乙胺
- [0802] TFA 三氟乙酸
- [0803] TFE 2,2,2-三氟乙醇
- [0804] THF 四氢呋喃

[0805] 此外,在本实施例中,应用以下缩写。Gly或G(甘氨酸)、Ile或I(异亮氨酸)、Leu或L(亮氨酸)、Phe或F(苯丙氨酸)、Pro或P(脯氨酸)、Thr或T(苏氨酸)。除这些外,应用表2中记载的缩写。

[0806] [表2]

[0807]

生物代码	结构	生物代码	结构
BdpFL-Phe		nBuG	
MeA3Pyr		Pic2	
StBuOH		dA	
MeSnPr		MeHph	
SPh2Cl		Thr (THP)	

[0808] 此外,LCMS的分析条件示于下述表3。

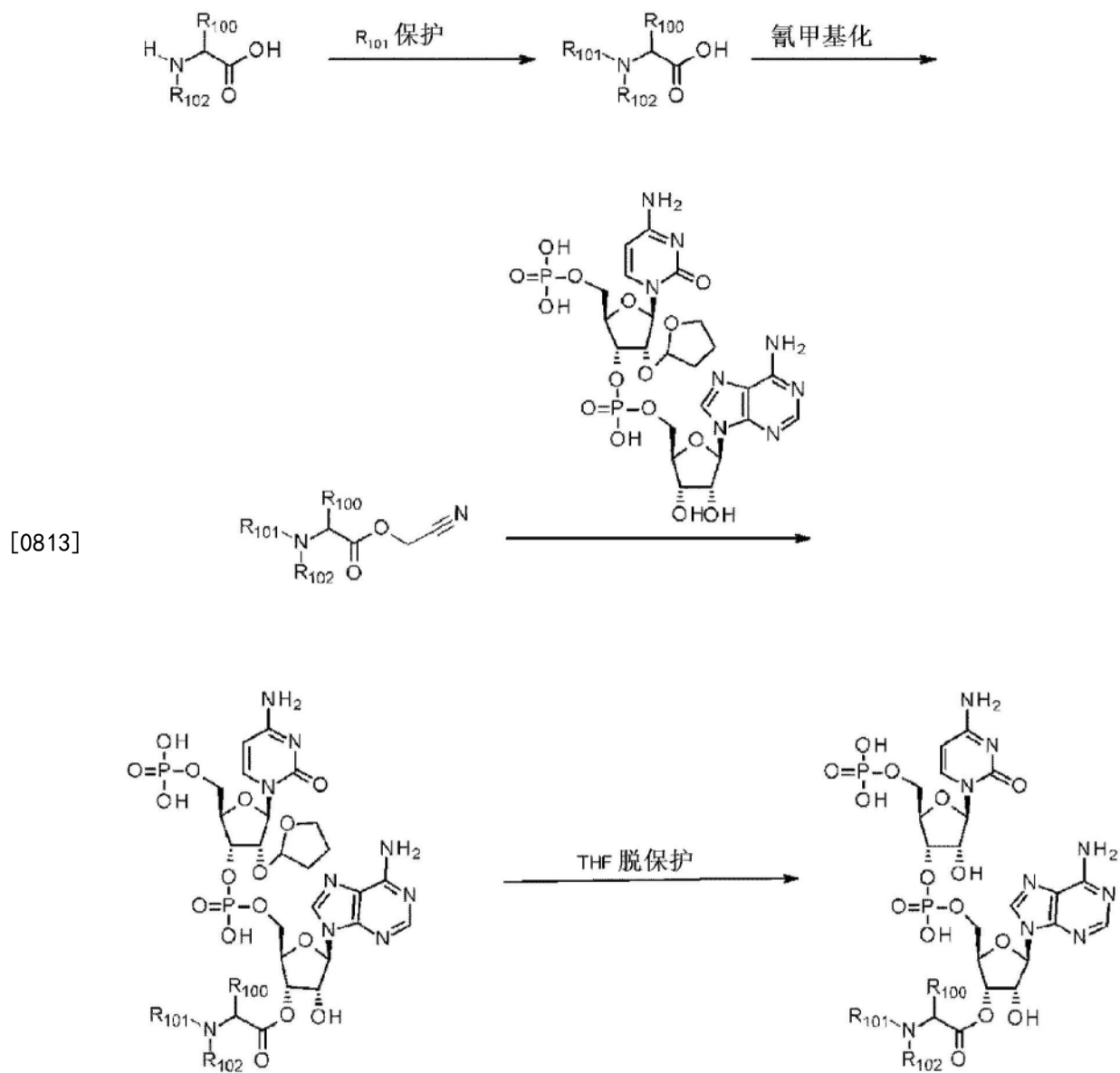
[0809] [表3]

[0810]

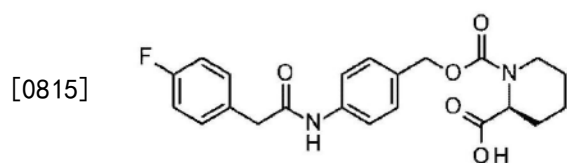
分离条件	装置	柱 (I.D. x 长度 (mm))	流动相	梯度 (A/B)	流速 (ml/分)	柱温度 (°C)	波长
S/D FA05-01	Acquity UPLC/S002	Aldrich Ascentis Express C18 1.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA, CH ₃ CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.0分 钟) $\Rightarrow$ 0/100 (0.4分 钟)	1	35	210-400nm PDA 总计
S/D FA05-02	Acquity UPLC/S002	Aldrich Ascentis Express C18 2.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA, CH ₃ CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.0分 钟) $\Rightarrow$ 0/100 (0.4分 钟)	0.9	35	210-400nm PDA 总计
S/D 方法 1	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	kinetex 2.6u XB-C18 100A 2.6 μ m (3.0 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA, CH ₃ CN	90/10 $\Rightarrow$ 0/100 (1.2 分钟) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 钟)	1.5	40	190-400nm PDA 总计
S/D 方法 2	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	kinetex 2.6u XB-C18 100A 2.6 μ m (2.1 x 50)	A) 0.05% TFA, H ₂ O B) 0.05% TFA, CH ₃ CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.1分 钟) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 钟)	1.0	40	190-400nm PDA 总计
S/D 方法 3	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-00S 2.2 μ m (3.0 x 50)	A) 0.05% TFA, H ₂ O B) 0.05% TFA, CH ₃ CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.1分 钟) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 钟)	1.2	40	190-400nm PDA 总计
S/D 方法 4	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTECS C18 2.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA, CH ₃ CN	90/10 $\Rightarrow$ 0/100 (1.2 分钟) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 钟)	1.0	40	190-400nm PDA 总计
S/D 方法 5	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	Ascentis Express C18 2.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.05% TFA, H ₂ O B) 0.05% TFA, CH ₃ CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.1分 钟) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 钟)	1.0	40	190-400nm PDA 总计

[0811] 实施例1.无细胞翻译系统中应用的pCpA-氨基酸的合成

[0812] 按照以下方案,合成氨酰化pCpA (SS14、SS15、SS16、SS48、SS49、SS50、SS51)。



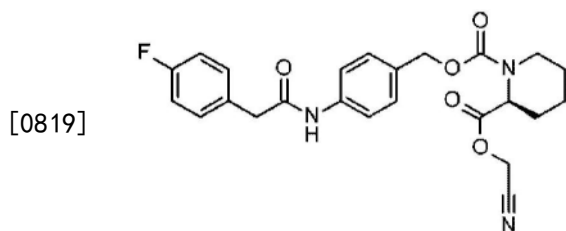
[0814] (S)-1-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)哌啶-2-甲酸(化合物SS17、F-Pnaz-Pic2-OH)的合成



[0816] 在氮气氛围下,在室温向(S)-哌啶-2-甲酸(42.6mg、0.33mmol)、用专利文献(WO2018143145A1)记载的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)碳酸苄酯(化合物ts11)(140mg、0.44mmol)的混合物添加DMF(330μL)。在室温搅拌5分钟后,在0℃添加三乙胺(105.6μL、2.25mmol)。在室温搅拌反应混合物30分钟后,用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化,得到(S)-1-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)哌啶-2-甲酸(化合物SS17、F-Pnaz-Pic2-OH)(92mg、67%)。LCMS(ESI)m/z=413(M-H)-

[0817] 保留时间:0.70分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0818] (S)-哌啶-1,2-二甲酸1-(4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)2-(氰甲基)(化合物SS18、F-Pnaz-Pic2-OCH₂CN)的合成

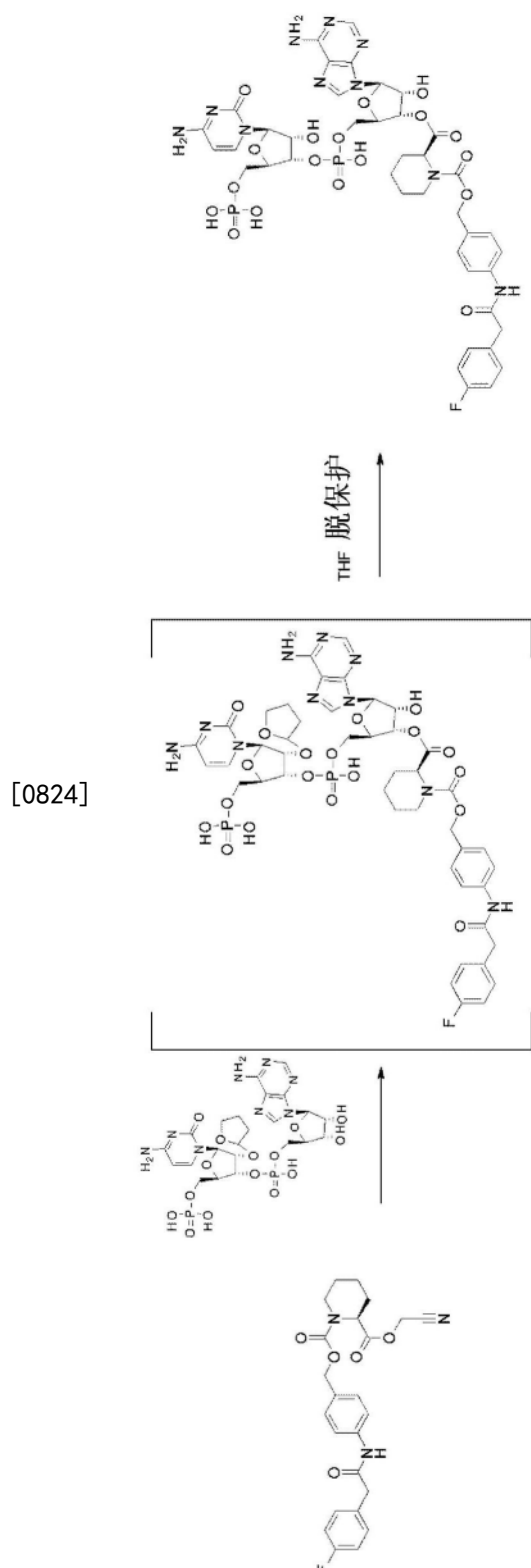


[0820] 在氮气氛下,将((S)-1-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)哌啶-2-甲酸(化合物SS17、F-Pnaz-Pic2-OH)(30mg、0.072mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(20.23μL、0.116mmol)溶解于乙腈(90μL),在0℃加入2-溴乙腈(5.34μL、0.080mmol),在室温搅拌2小时。浓缩反应液,得到粗产物(S)-哌啶-1,2-二甲酸1-(4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)2-(氰甲基)(化合物SS18、F-Pnaz-Pic2-OCH₂CN)。将得到的粗产物溶解于乙腈(2.00mL),原样用于下一步骤。

[0821] LCMS (ESI) m/z=452 (M-H) -

[0822] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0823] (2S)-哌啶-1,2-二甲酸1-(4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)2-((2R,3S,4R,5R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基-2-((磷酸基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基)(化合物SS14、F-Pnaz-Pic2-pCpA)的合成



[0825] 在缓冲液A (40mL) 中溶解用文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310) 记载的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基磷酸二氢酯(化合物pc01) (113mg、0.156mmol), 给予(S)-哌啶-1,2-二甲酸1-(4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)2-(氰甲基)(化合物SS18、F-Pnaz-Pic2-OCH₂CN) (35.4mg、0.078mmol) 的乙腈溶液(2.00mL), 在室温搅拌150分钟。在0℃

冷却反应液后,加入三氟乙酸(2.00mL)。在0℃搅拌反应液45分钟后,用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)纯化反应液,得到标题化合物(化合物SS14、F-Pnaz-Pic2-pCpA)(6.0mg、7.3%)。

[0826] LCMS (ESI) $m/z = 1047.5$ (M-H) -

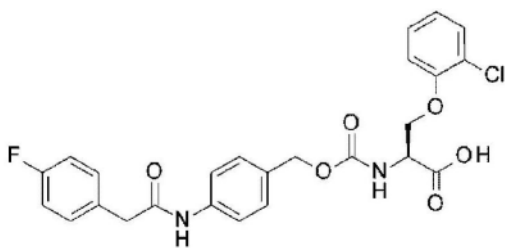
[0827] 保留时间:0.50分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0828] 另外,缓冲液A如下配制。

[0829] 向N,N,N-三甲基十六烷-1-氯化铵(6.40g、20mmol)和咪唑(6.81g、100mmol)的水溶液添加乙酸,得到pH8、20mM N,N,N-三甲基十六烷-1-铵、100mM咪唑的缓冲液A(1L)。

[0830] 0-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸(化合物SS19、F-Pnaz-SPh2C1-OH)的合成

[0831]



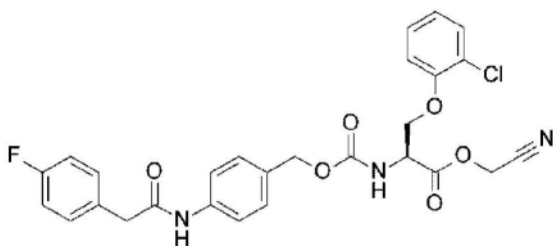
[0832] 在氮气氛围下,在室温向用专利文献(WO2018225864)记载的方法合成的0-(2-氯苯基)-L-丝氨酸(化合物aa63)(1.25g、5.80mmol)、用专利文献(WO2018143145A1)记载的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)碳酸苄酯(化合物ts11)(2g、4.71mmol)的混合物添加DMSO(15mL)、三乙胺(0.95g、9.42mmol)。在室温搅拌反应混合物16小时后,用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化,得到0-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸(化合物SS19、F-Pnaz-SPh2C1-OH)(1.8g、73%)。

[0833] LCMS (ESI) $m/z = 523$ (M+Na) +

[0834] 保留时间:1.26分钟(分析条件SMD方法6)

[0835] 0-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS20、F-Pnaz-SPh2C1-OCH₂CN)的合成

[0836]

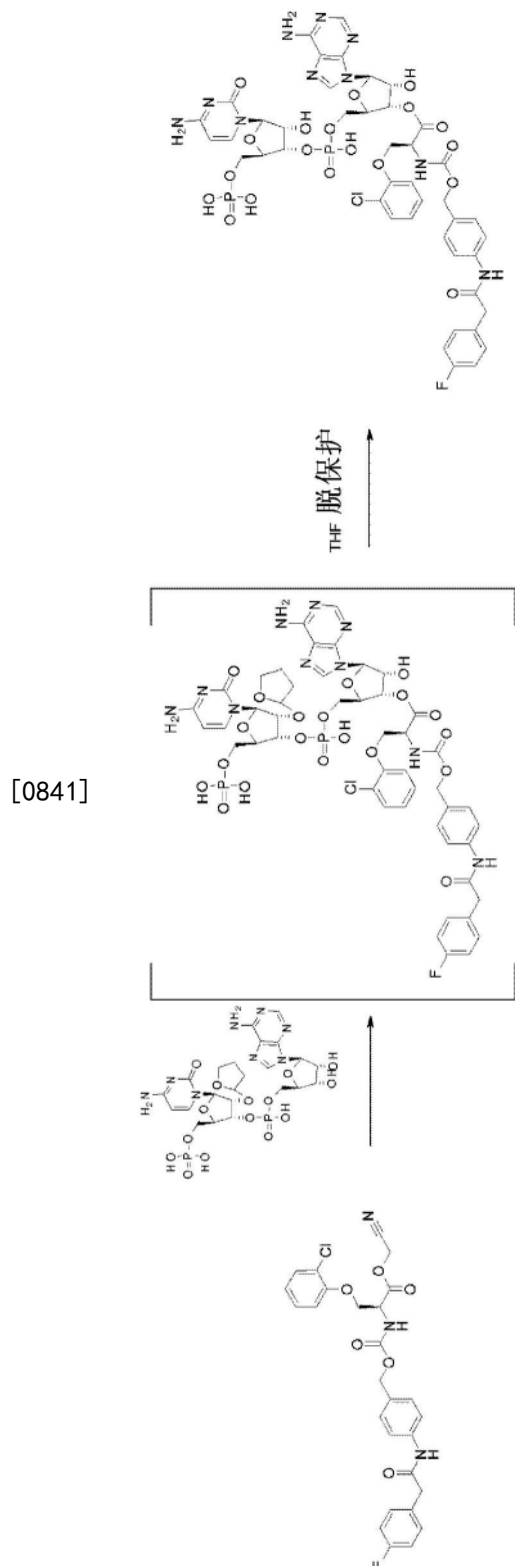


[0837] 在氮气氛围下,将0-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸(化合物SS19、F-Pnaz-SPh2C1-OH)(800mg、1.60mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(0.412g、3.19mmol)溶解于DCM(15mL),在室温加入2-溴乙腈(760mg、6.34mmol),在室温搅拌16小时。浓缩反应液,用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化,得到0-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS20、F-Pnaz-SPh2C1-OCH₂CN)(220mg、26%)。将得到的产物溶解于乙腈(5mL),用于下一步骤。

[0838] LCMS (ESI) $m/z = 562$ (M+Na) +

[0839] 保留时间: 1.15 分钟 (分析条件 SMD 方法 4)

[0840] (2R,3S,4R,5R) -2-((((((2R,3S,4R,5R) -5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基-2-((磷酰基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基)-O-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸酯 (化合物 SS15、F-Pnaz-SPh2Cl-pCpA) 的合成

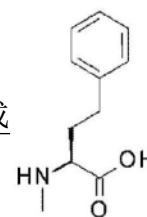


[0842] 在缓冲液A (100mL) 中溶解 ((2R,3R,4R,5R) -5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基) -3- (((((2R,3S,4R,5R) -5- (6-氨基-9H-嘌呤-9-基) -3,4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) -4- ((四氢呋喃-2-基) 氧基) 四氢呋喃-2-基) 甲基磷酸二氢酯 (化合物pc01) (400mg、0.55mmol), 使用注射泵经15分钟以上滴加0- (2-氯苯基) -N- (((4- (2- (4-氟苯基) 乙酰氨基) 苄基) 氧基) 羰基) -L-丝氨酸氰甲酯 (化合物SS20、F-Pnaz-SPh2C1-OCH₂CN) (220mg、0.41mmol) 的乙腈溶液 (5mL), 在室温搅拌5分钟。然后, 向反应液加入三氟乙酸 (2.3mL)。冷冻干燥反应液后, 用反相硅胶柱色谱 (0.05% 三氟乙酸水溶液/0.05% 三氟乙酸乙腈) 纯化, 得到标题化合物 (化合物SS15、F-Pnaz-SPh2C1-pCpA) (20.7mg、2%)。

[0843] LCMS (ESI) m/z = 1133.4 (M-H) -

[0844] 保留时间: 0.55分钟 (分析条件SQDFA05_01)

[0845] ((S) -2- (甲基氨基) -4-苯基丁酸 (化合物SS21、MeHph-OH) 的合成



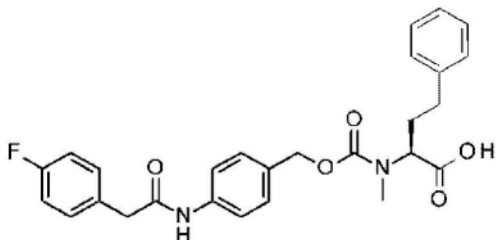
[0846] 在室温向用专利文献 (W02018225864) 记载的方法合成的 (S) -2- ((((9H-芴-9-基) 甲氧基) 羰基) (甲基) 氨基) -4-苯基丁酸 (化合物aa11) (150mg、0.361mmol) 添加DCM (903μL)、水 (903μL) 和哌啶 (178μL、1.805mmol)。在室温搅拌反应混合物30分钟后, 用反相硅胶柱色谱 (0.1% 甲酸水溶液/0.1% 甲酸乙腈溶液) 纯化, 得到 ((S) -2- (甲基氨基) -4-苯基丁酸 (化合物SS21、MeHph-OH) (55mg、79%)。

[0847] LCMS (ESI) m/z = 192 (M-H) -

[0848] 保留时间: 0.15分钟 (分析条件SQDFA05_02)

[0849] (S) -2- ((((4- (2- (4-氟苯基) 乙酰氨基) 苄基) 氧基) 羰基) (甲基) 氨基) -4-苯基丁酸 (化合物SS22、F-Pnaz-MeHph-OH) 的合成

[0850]

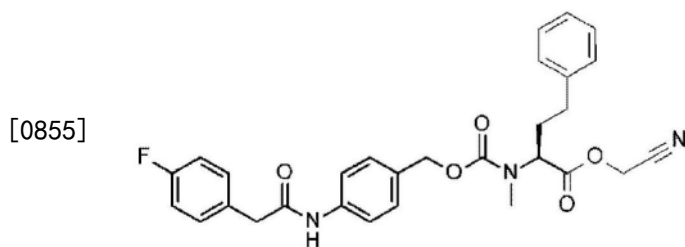


[0851] 在氮气氛下, 在室温向 ((S) -2- (甲基氨基) -4-苯基丁酸 (化合物SS21、MeHph-OH) (35.1mg、0.182mmol)、用专利文献 (W02018143145A1) 记载的方法合成的 (4-硝基苯基) -4- (2- (4-氟苯基) 乙酰氨基) 碳酸苄酯 (化合物ts11) (85mg、0.20mmol) 的混合物添加DMSO (727μL)。在50℃添加三乙胺 (76μL、0.545mmol)。在40℃搅拌反应混合物16小时后, 用反相硅胶柱色谱 (0.1% 甲酸水溶液/0.1% 甲酸乙腈溶液) 纯化, 得到 (S) -2- ((((4- (2- (4-氟苯基) 乙酰氨基) 苄基) 氧基) 羰基) (甲基) 氨基) -4-苯基丁酸 (化合物SS22、F-Pnaz-MeHph-OH) (80mg、92%)。

[0852] LCMS (ESI) m/z = 477 (M-H) -

[0853] 保留时间: 0.85分钟 (分析条件SQDFA05_02)

[0854] (S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-4-苯基丁酸氰甲酯(化合物SS23、F-Pnaz-MeHph-OCH₂CN)的合成

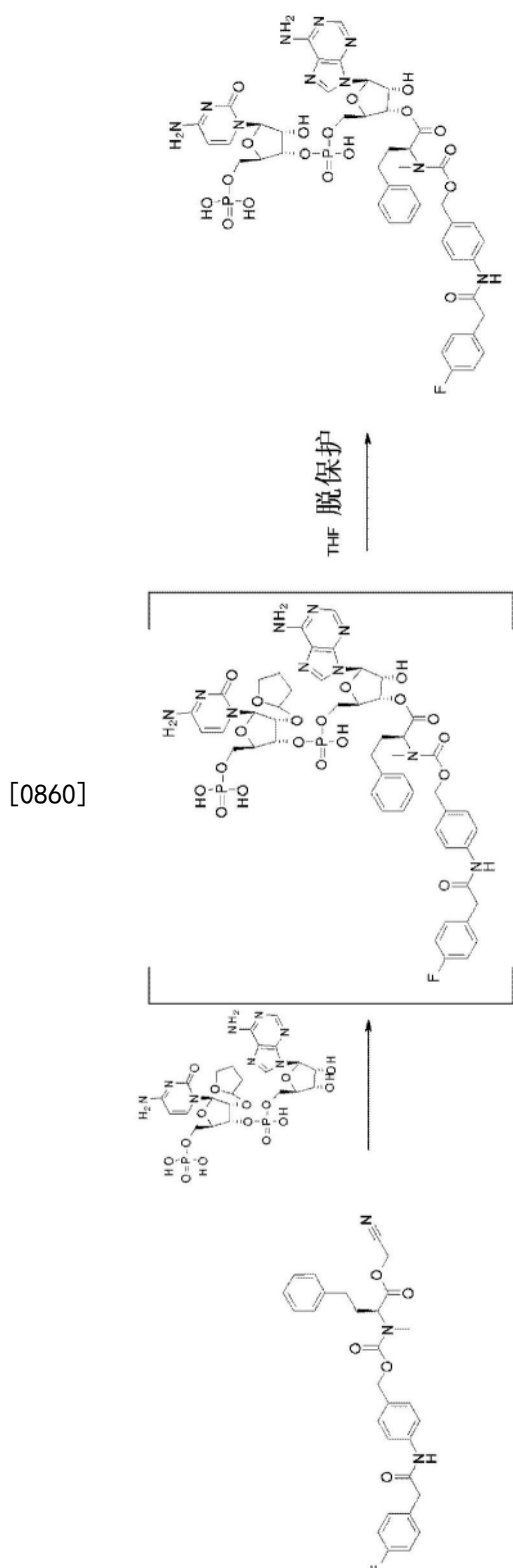


[0856] 在氮气氛下,在室温向(S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-4-苯基丁酸(化合物SS22、F-Pnaz-MeHph-OH) (77mg、0.16mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA) (31μL、0.176mmol)的混合物加入乙腈(533μL)。其后,在室温加入2-溴乙腈(86μL、1.280mmol),在40℃搅拌反应混合物1小时。浓缩反应液,得到粗产物(S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-4-苯基丁酸氰甲酯(化合物SS23、F-Pnaz-MeHph-OCH₂CN)。将得到的粗产物溶解于乙腈(5.00mL),原样用于下一步骤。

[0857] LCMS (ESI) m/z=516 (M-H) -

[0858] 保留时间:0.92分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0859] (2S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-4-苯基丁酸(2R,3S,4R,5R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基-2-((磷酰基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基(化合物SS16、F-Pnaz-MeHph-pCpA)的合成



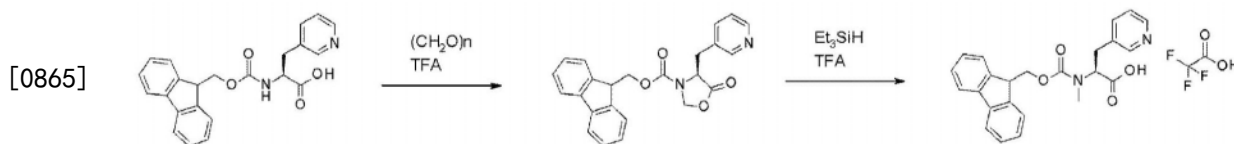
[0861] 在缓冲液A (100mL) 中溶解 ((2R,3R,4R,5R) -5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((((2R,3S,4R,5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基)(羟基) 磷酸基) 氧基)-4-((四氢呋喃-2-基) 氧基) 四氢呋喃-2-基) 甲基磷酸二氢酯(化合物pc01) (127mg、0.176mmol), 给予(S) -2-((((4-(2-(4-氟苯基) 乙酰氨基) 苄基) 氧基) 羰基)(甲基) 氨基)-4-苯基丁酸酐甲酯(化合物SS23、F-Pnaz-MeHph-OCH₂CN) (83mg、0.16mmol) 的乙腈溶液 (5.00mL), 在室温搅拌1小时。在0℃冷却反应液后, 加入三氟乙酸 (5.00mL)。在0℃

搅拌反应液1小时后,将反应液用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)纯化,其后进一步用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化,得到标题化合物(化合物SS16、F-Pnaz-MeHph-pCpA)(26mg、14.6%)。

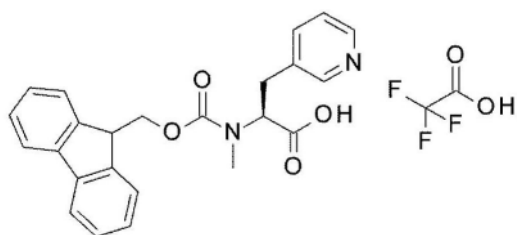
[0862] LCMS (ESI) $m/z = 1111.5$ (M-H) -

[0863] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0864] 化合物SS48的合成中间体按照以下方案合成。



[0866] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸化合物2,2,2-三氟乙酸盐(化合物SS52、Fmoc-MeA3Pyr-OH·TFA)的合成



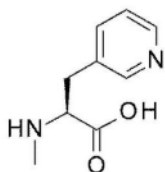
[0867] 将(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(15g、38.62mmol)、三氟乙酸(27mL、348mmol)和低聚甲醛($(CH_2O)_n$)(3.48g、116mmol)悬浮于甲苯(50mL),在氮气氛下,在40℃搅拌16小时。冷却至室温后,将反应液减压浓缩。用DCM溶解残渣,用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。用无水硫酸钠干燥有机层后,通过过滤和减压浓缩除去溶剂,作为粗产物得到(S)-5-氧代-4-(吡啶-3-基甲基)噁唑烷-3-甲酸(9H-芴-9-基)甲酯。

[0868] 将作为得到的粗产物的(S)-5-氧代-4-(吡啶-3-基甲基)噁唑烷-3-甲酸(9H-芴-9-基)(18g、44.95mmol)溶解于二氯乙烷(100mL),在室温加入三乙基硅烷(Et_3SiH)(47g、404.20mmol)和三氟乙酸(100mL)。在氮气氛下、在70℃搅拌反应液16小时后,减压浓缩反应液。将得到的残渣溶解于乙酸异丙酯,加入叔丁基甲醚和己烷的混合溶液(9:1)。在室温搅拌该溶液20分钟后,在4℃静置1小时。过滤回收生成的沉淀物,用冷却的叔丁基甲醚和己烷的混合溶液(9:1)洗涤,得到(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸化合物2,2,2-三氟乙酸盐(化合物SS52、Fmoc-MeA3Pyr-OH·TFA)(19g、95%)。

[0869] LCMS (ESI) $m/z = 403$ (M+H) +

[0870] 保留时间:0.77分钟(分析条件SMD方法1)

[0871] (S)-2-(甲基氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(化合物SS53、MeA3Pyr-OH)的合成



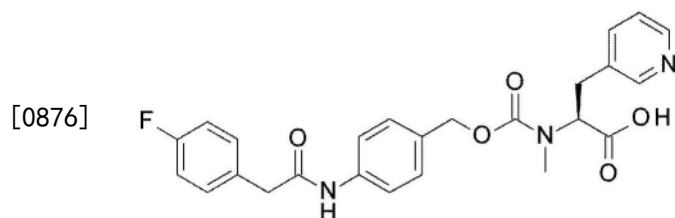
[0872] 在室温向(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸化合物2,2,2-三氟乙酸盐(化合物SS52、Fmoc-MeA3Pyr-OH·TFA)(19g、47.21mmol)添加DMF(72mL)和哌啶(28.5mL),在室温搅拌反应混合物3小时。加入二乙醚(140mL)和己烷

(280mL), 在室温进一步搅拌3小时。过滤回收生成的沉淀物, 定量地得到(S)-2-(甲基氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(化合物SS53、MeA3Pyr-OH) (7g)。

[0873] LCMS (ESI) $m/z = 181$ (M+H) +

[0874] 保留时间: 0.15分钟(分析条件SMD方法2)

[0875] (S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(化合物SS54、F-Pnaz-MeA3Pyr-OH)的合成

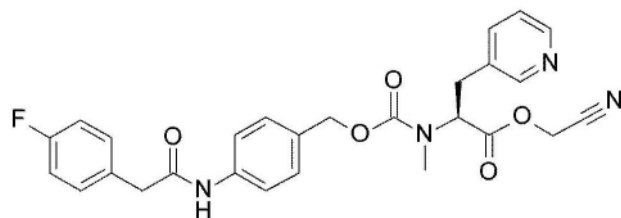


[0877] 在氮气氛围下, 在室温向(S)-2-(甲基氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(化合物SS53、MeA3Pyr-OH) (970mg、5.38mmol)、用专利文献(WO2018143145A1)记载的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)碳酸苄酯(化合物ts11) (2g、4.71mmol)的混合物添加DMSO (15mL)、三乙胺 (950mg、9.43mmol)。在40℃搅拌反应混合物16小时后, 用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化, 得到(S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(化合物SS54、F-Pnaz-MeA3Pyr-OH) (1.0g、46%)。

[0878] LCMS (ESI) $m/z = 466$ (M+H) +

[0879] 保留时间: 0.98分钟(分析条件SMD方法3)

[0880] (S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸氰甲酯(化合物SS55、F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH₂CN)的合成

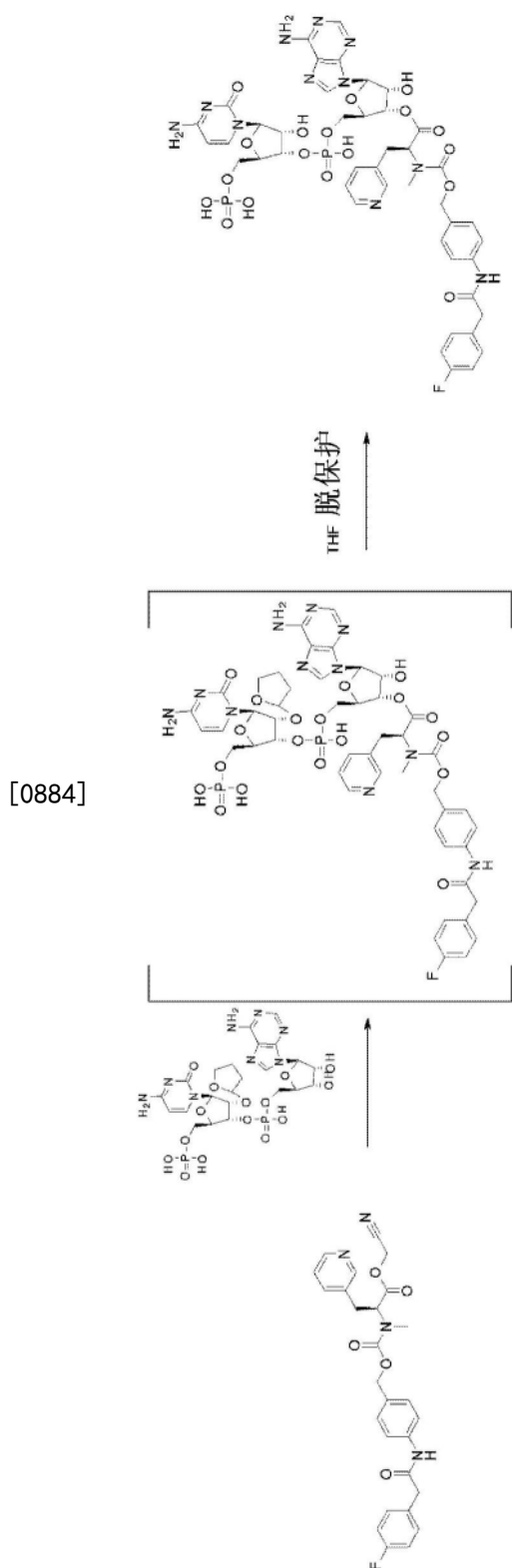


[0881] 在氮气氛围下, 将(S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(化合物SS54、F-Pnaz-MeA3Pyr-OH) (800mg、1.72mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA) (444mg、3.44mmol)的混合物溶解于DCM (20mL), 在室温加入2-溴乙腈 (818mg、6.82mmol), 在室温搅拌6小时。浓缩反应液, 用正相硅胶柱色谱(乙酸乙酯/石油醚)纯化, 得到(S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸氰甲酯(化合物SS55、F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH₂CN) (221mg、25%)。LCMS (ESI) $m/z = 505$ (M+H) +

[0882] 保留时间: 0.83分钟(分析条件SMD方法4)

[0883] (2S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸(2R,3S,4R,5R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基-2-((膦酰基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)膦酰基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基(化合物SS48、F-Pnaz-MeA3Pyr-pCpA)的合

成



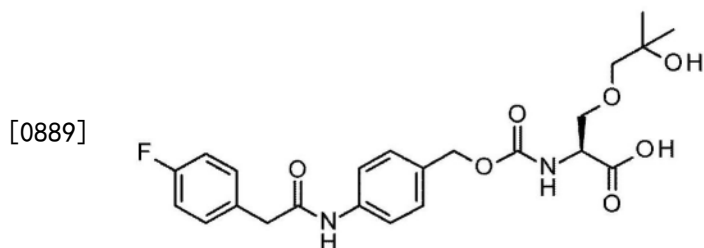
[0885] 在缓冲液A (100mL) 中溶解用文献 (Helv.Chim.Acta, 90, 297-310) 记载的方法合成的 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1 (2H) -基) - 3- (((((2R, 3S, 4R, 5R) - 5- (6-氨基-9H-嘌呤-9-基) - 3, 4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) - 4- ((四氢呋喃-2-基) 氧基) 四氢呋喃-2-基) 甲基磷酸二氢酯 (化合物pc01) (400mg、0.55mmol), 应用注射泵经1分钟分以上滴加 (S) - 2- (((4- (2- (4-氟苯基) 乙酰氨基) 苄基) 氧基) 羰基) (甲基)

氨基)-3-(吡啶-3-基)丙酸氰甲酯(化合物SS55、F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH₂CN)(146mg、0.29mmol)的乙腈溶液(5mL),在室温搅拌1小时。向反应液加入三氟乙酸(2.3mL),将反应液冷冻干燥后,用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)纯化,得到标题化合物(化合物SS48、F-Pnaz-MeA3Pyr-pCpA)(64.4mg、5%)。

[0886] LCMS (ESI) $m/z = 1098.5$ (M-H) -

[0887] 保留时间:0.39分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0888] N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羧基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸(,化合物SS56、F-Pnaz-StBuOH-OH)的合成

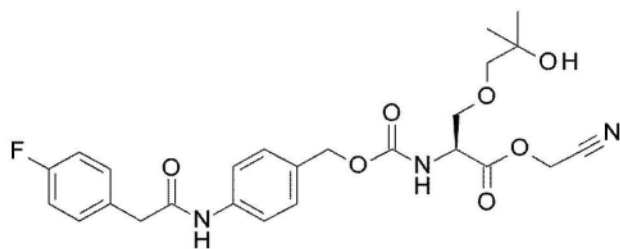


[0890] 在氮气氛下,在室温向用专利文献(W02018225864)记载的方法合成的O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸(0.5g、2.83mmol)、用专利文献(W02018143145A1)记载的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)碳酸苄酯(化合物ts11)(1g、2.36mmol)的混合物添加DMSO(7mL)、三乙胺(0.65mL、4.72mmol)。在室温搅拌反应混合物16小时后,用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化,得到N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羧基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸(化合物SS56、F-Pnaz-StBuOH-OH)(1g、92%)。

[0891] LCMS (ESI) $m/z = 485$ (M+Na) +

[0892] 保留时间:0.80分钟(分析条件SMD方法5)

[0893] N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羧基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS57、F-Pnaz-StBuOH-OCH₂CN)的合成



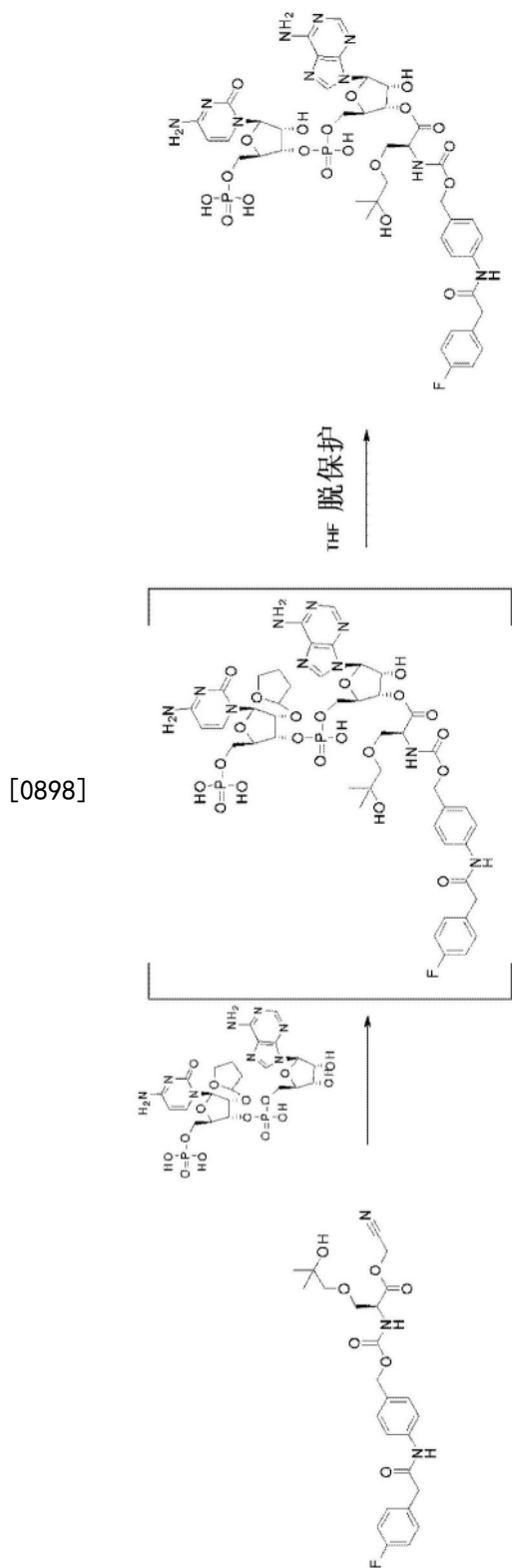
[0894] 在氮气氛下,将N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羧基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸(化合物SS56、F-Pnaz-StBuOH-OH)(1.2g、2.59mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(670mg、5.18mmol)溶解于DCM(36mL),在室温加入2-溴乙腈(1.23g、10.25mmol),在室温搅拌48小时。浓缩反应液,用正相硅胶柱色谱(乙酸乙酯/石油醚)纯化,得到N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羧基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS57、F-Pnaz-StBuOH-OCH₂CN)(1g、77%)。

[0895] LCMS (ESI) $m/z = 524$ (M+Na) +

[0896] 保留时间:0.97分钟(分析条件SMD方法4)

[0897] (2R,3S,4R,5R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-

羟基-2-((磷酸基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸酯(化合物SS49、F-Pnaz-StBuOH-pCpA)的合成



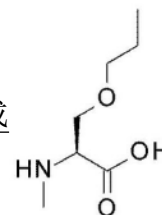
[0899] 在缓冲液A(100mL)中溶解用文献(HeIv.Chim.Acta,90,297-310)记载的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-4-((四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸酯(化合物SS49、F-Pnaz-StBuOH-pCpA)的合成

喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基磷酸二氢酯(化合物pc01)(400mg、0.55mmol),应用注射泵经15分钟以上滴加N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-O-(2-羟基-2-甲基丙基)-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS57、F-Pnaz-StBuOH-OCH₂CN)(139mg、0.28mmol)的乙腈溶液(5mL),在室温搅拌1小时。向反应液加入三氟乙酸(2.3mL),冷冻干燥反应液后,用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)纯化,得到标题化合物(化合物SS49、F-Pnaz-StBuOH-pCpA)(55.3mg、5%)。

[0900] LCMS (ESI) $m/z = 1095.4$ (M-H) -

[0901] 保留时间:0.46分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0902] N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸(化合物SS58、MeSnPr-OH)的合成



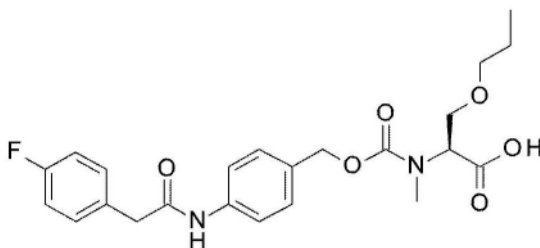
[0903] 在室温向用专利文献(W02018225864)记载的方法合成的(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-4-苯基丁酸(化合物aa52)(20g、52.16mmol)添加DMF(80mL)和哌啶(30mL),在室温搅拌反应混合物3小时。加入二乙基醚(160mL)和己烷(500mL),在室温进一步搅拌3小时。过滤回收生成的沉淀物,得到N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸(化合物SS58、MeSnPr-OH)(7g、83%)。

[0904] LCMS (ESI) $m/z = 162$ (M+H) +

[0905] 保留时间:0.34分钟(分析条件SMD方法2)

[0906] N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸(化合物SS59、F-Pnaz-MeSnPr-OH)的合成

[0907]



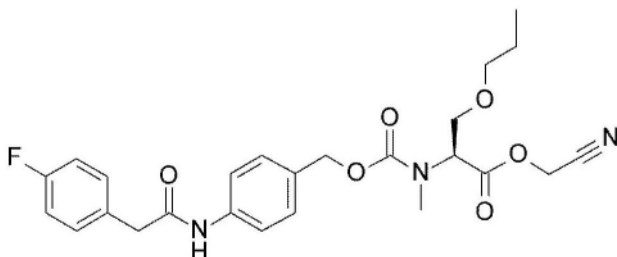
[0908] 在氮气氛围下,在室温向N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸(化合物SS58、MeSnPr-OH)(920mg、5.71mmol)、用专利文献(W02018143145A1)记载的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)碳酸苄酯(化合物ts11)(2g、4.71mmol)的混合物添加DMSO(15mL)、三乙胺(1.3mL、9.43mmol)。在室温搅拌反应混合物16小时后,用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化,得到N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸(化合物SS59、F-Pnaz-MeSnPr-OH)(2g、95%)。

[0909] LCMS (ESI) $m/z = 469$ (M+Na) +

[0910] 保留时间:1.23分钟(分析条件SMD方法3)

[0911] N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS60、F-Pnaz-MeSnPr-OCH₂CN)的合成

[0912]

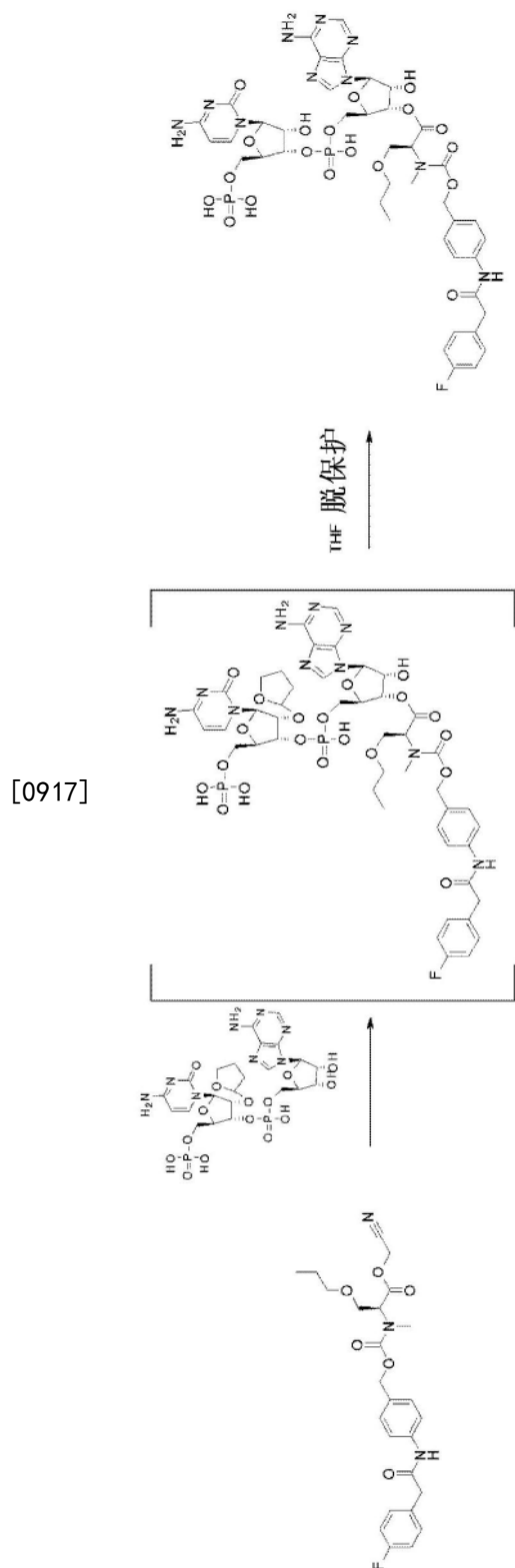


[0913] 在氮气氛下,将N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸(化合物SS59、F-Pnaz-MeSnPr-OH) (2.2g、4.93mmol) 和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA) (1.28g、9.90mmol) 的混合物溶解于DCM (40mL), 在室温加入2-溴乙腈 (2.35g、19.59mmol), 在室温搅拌48小时。浓缩反应液,用正相硅胶柱色谱(乙酸乙酯/石油醚)纯化,得到N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS60、F-Pnaz-MeSnPr-OCH₂CN) (2g、84%)。

[0914] LCMS (ESI) $m/z = 508 (M+Na)^+$

[0915] 保留时间:1.32分钟(分析条件SMD方法3)

[0916] (2R,3S,4R,5R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基-2-((磷酰基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸酯(化合物SS50、F-Pnaz-MeSnPr-pCpA)的合成



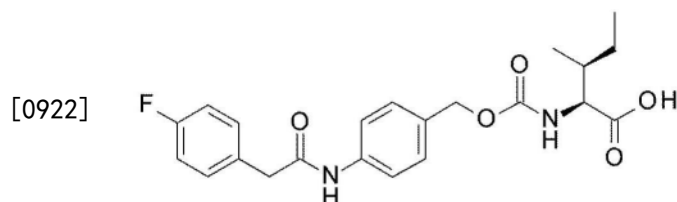
[0918] 在缓冲液A(100mL)中溶解用文献(HeIv.Chim.Acta,90,297-310)记载的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基磷酸二氢酯(化合物pc01)(400mg、0.55mmol),应用注射泵经15分钟以上滴加N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基-O-丙基-L-丝氨酸氰甲酯(化合物SS60、F-Pnaz-MeSnPr-OCH₂CN)(135mg、0.28mmol)的乙腈溶液

(5mL), 在室温搅拌4小时。向反应液加入三氟乙酸(2.3mL), 冷冻干燥反应液后, 用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)纯化, 得到标题化合物(化合物SS50、F-Pnaz-MeSnPr-pCpA)(70.2mg、6%)。

[0919] LCMS (ESI) $m/z = 1079.5$ (M-H) -

[0920] 保留时间: 0.52分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0921] (((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-异亮氨酸(化合物SS61、F-Pnaz-Ile-OH)的合成

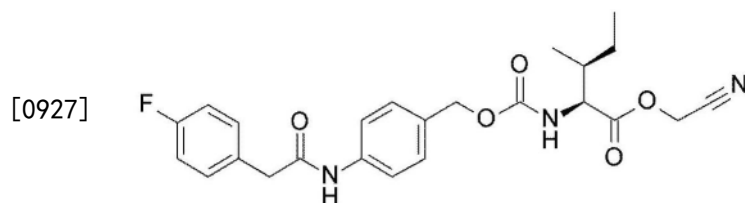


[0923] 在氮气氛下, 在室温向L-异亮氨酸(52.5mg、0.40mmol)、用专利文献(WO2018143145A1)记载的方法合成的(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)碳酸苄酯(化合物ts11)(178mg、0.42mmol)的混合物添加DMSO(2mL)、三乙胺(128μL、0.92mmol)。在室温搅拌反应混合物2.5天后, 用反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)纯化, 得到(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-异亮氨酸(化合物SS61、F-Pnaz-Ile-OH)(125mg、75%)。

[0924] LCMS (ESI) $m/z = 415.4$ (M-H) -

[0925] 保留时间: 0.74分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0926] (((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-异亮氨酸氰甲酯(化合物SS62、F-Pnaz-Ile-OCH₂CN)的合成

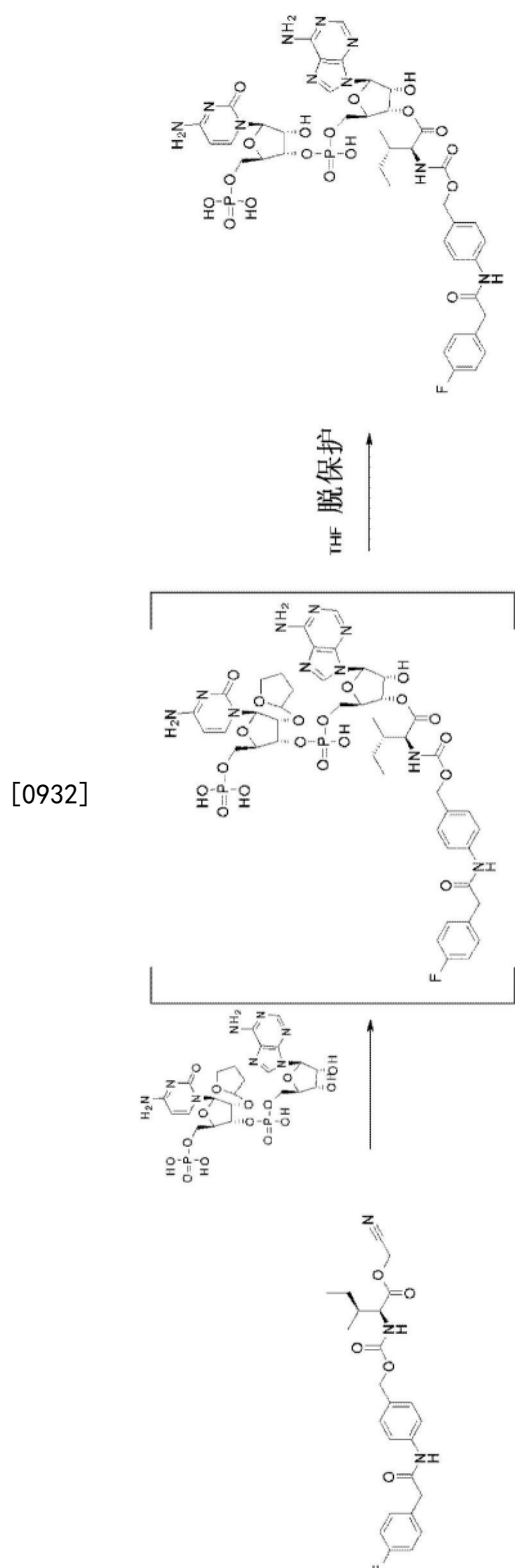


[0928] 在氮气氛下, 将(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-异亮氨酸(化合物SS61、F-Pnaz-Ile-OH)(42mg、0.1mmol)和2-溴乙腈(13μL、0.200mmol)溶解于乙腈(500μL), 在室温加入N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(35μL、0.200mmol), 在室温搅拌16小时。浓缩反应液, 得到粗产物(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-异亮氨酸氰甲酯(化合物SS62、F-Pnaz-Ile-OCH₂CN)。将得到的粗产物溶解于乙腈(3.00mL), 原样用于下一步骤。

[0929] LCMS (ESI) $m/z = 454$ (M-H) -

[0930] 保留时间: 0.83分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0931] (2R,3S,4R,5R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基-2-(磷酸基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-异亮氨酸酯(化合物SS51、F-Pnaz-Ile-pCpA)的合成



[0933] 在缓冲液A (60mL) 中溶解用文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310) 记载的方法合成的((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基磷酸二氢酯(化合物pc01) (72.2mg、0.100mmol), 给予(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-异亮氨酸氰甲酯(化合物SS62、F-Pnaz-Ile-OCH₂CN) (45.5mg、0.100mmol) 的乙腈溶液(3.00mL), 在室温搅拌20小时。在0℃冷

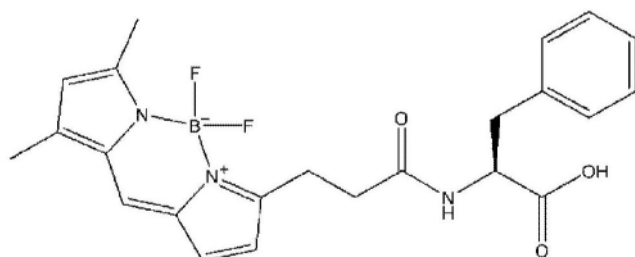
却反应液后,加入三氟乙酸(3.00mL)。在室温搅拌反应液30分钟后,用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)纯化反应液,得到标题化合物(化合物SS51、F-Pnaz-Ile-pCpA)(12mg,11.4%)。

[0934] LCMS (ESI) m/z = 1049.4 (M-H) -

[0935] 保留时间:0.54分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0936] 实施例2.BdpFL-Phe-pCpA (MT01) 的合成

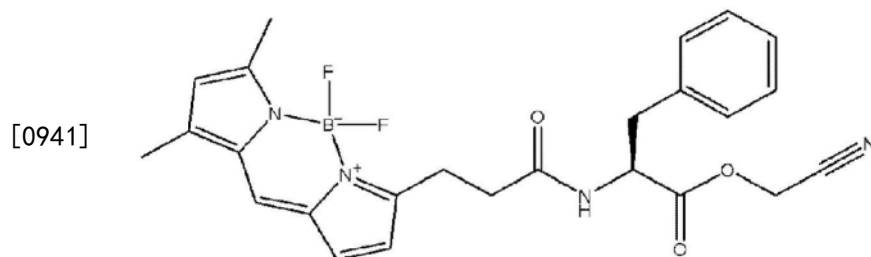
[0937] (3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4 λ 4,5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸(化合物MT02、BdDFL-Phe-OH)的合成



[0938] 在氮气氛下,在室温向3-(2-羧基乙基)-5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-4-鎓(200mg,0.685mmol)和1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(87mg,0.753mmol)的NMP(4.5mL)溶液加入DIC(0.128ml,0.822mmol)后,在40℃搅拌过夜。回到室温后,向反应液加入L-苯丙氨酸(113mg,0.685mmol)和TEA(0.191ml,1.369mmol),在40℃搅拌过夜。用反相柱色谱(0.1%FA MeCN/H₂O)纯化反应液,得到(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4 λ 4,5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸(化合物MT02、BdpFL-Phe-OH)(102mg,34%收率)。LCMS (ESI) m/z = 438.3 (M-H) -

[0939] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0940] (3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4 λ 4,5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸氰基甲酯(化合物MT03、BdpFL-Phe-OCH₂CN)的合成



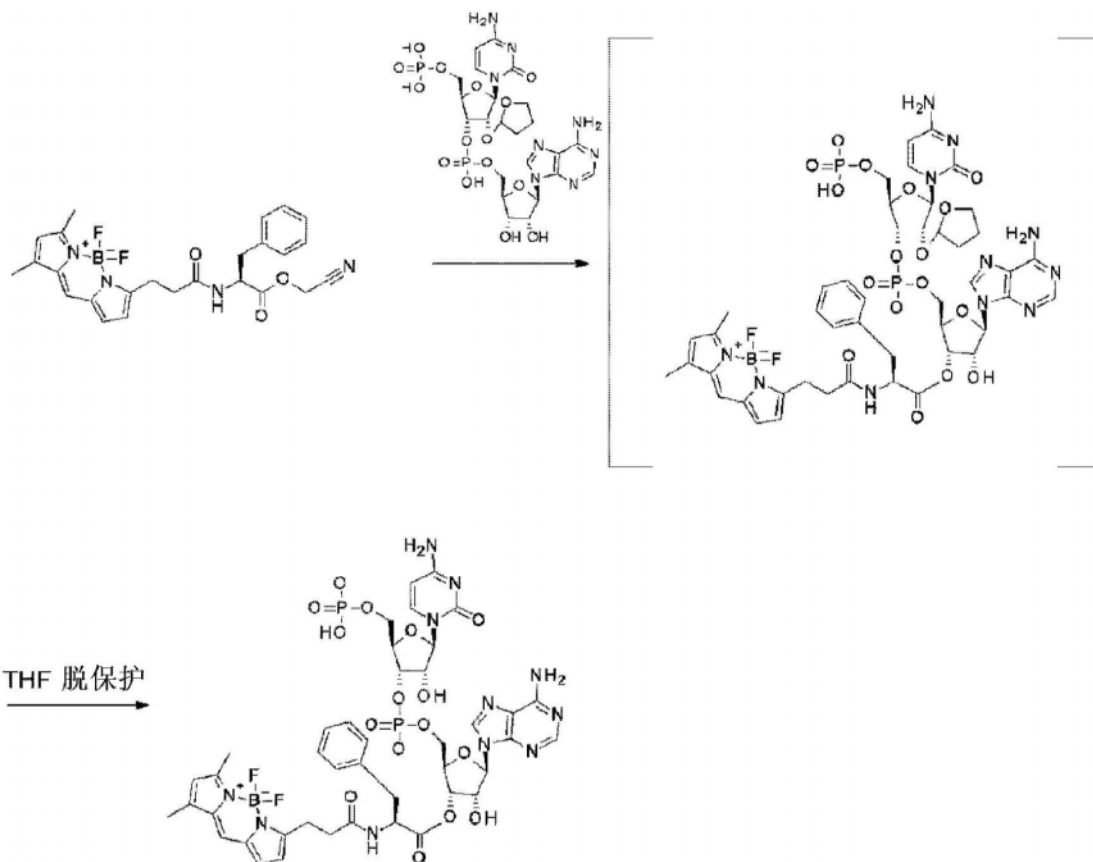
[0942] 在氮气氛下,将(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4 λ 4,5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸(50mg,0.114mmol)和N-乙基-异丙基丙-2-胺(DIPEA)(31.0 μ L,0.177mmol)溶解于乙腈(500 μ L),在0℃加入2-溴乙腈(12 μ L,0.177mmol)后,在40℃搅拌3小时。浓缩反应液,作为粗产物得到(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4 λ 4,5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸氰基甲酯(化合物MT03、BdpFL-Phe-OCH₂CN)。得到的粗产物原样用于下一步骤。LCMS (ESI) m/z = 477.3 (M-H) -

[0943] 保留时间:0.86分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0944] 3-(3-(((2S)-1-(((2R,3S,4R,5R)-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代吡

啉-1(2H)-基)-4-羟基-2-((磷酰基氧基)甲基)四氢呋喃-3-基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)甲基)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基)氧基)-1-氧代-3-苯基丙烷-2-基)氨基)-3-氧代丙基)-5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-4-鎓(化合物MT01、BdpFL-Phe-pCpA)的合成

[0945]



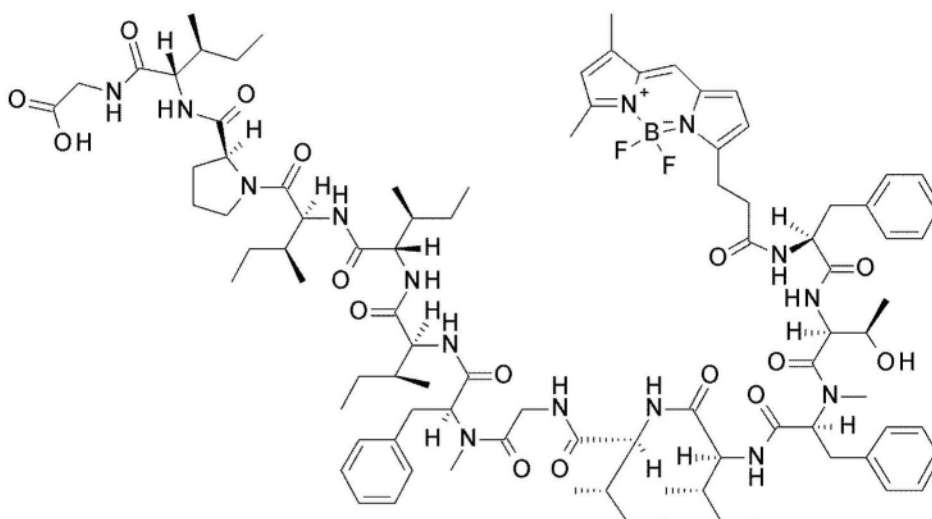
[0946] 在缓冲液A(11.3mL)中溶解((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基磷酸二氢酯(化合物pc01)(33.2mg、0.046mmol),加入(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4 λ 4,5 λ 4-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]二氮杂硼烷-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸氰基甲酯(化合物MT03、BdpFL-Phe-OCH₂CN)(11mg、0.023mmol)的乙腈溶液(0.13mL)后,在室温搅拌45分钟。在0℃向反应液加入TFA(0.56mL),搅拌5分钟后,在室温搅拌10分钟。用反相硅胶柱色谱(0.05%TFA MeCN/H₂O)纯化反应液,得到标题化合物(化合物MT01、BdpFL-Phe-pCpA)(2.1mg、8.5%收率)。

[0947] LCMS (ESI) m/z = 1072.5 (M-H) -

[0948] 保留时间:0.56分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0949] 实施例3. 作为LC/MS的标准品应用的N末端具有BdpFL的肽(LCT-67)的合成

[0950]



[0951] 应用负载Fmoc-Gly-OH的2-氯三苯甲基树脂(100mg),应用作为Fmoc氨基酸的Fmoc-Gly-OH、用专利文献(WO2018225864)记载的方法合成的Fmoc-Thr(THP)-OH(aa01)、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-MePhe-OH、Fmoc-Pro-OH,用肽合成仪进行肽的延伸(关于氨基酸的缩写在本说明书中另外记载)。按照通过Fmoc法的肽合成法,进行肽的延伸(WO2013100132B2)。肽的延伸后,在肽合成仪上进行N末端的Fmoc基的除去后,用DCM洗涤树脂。

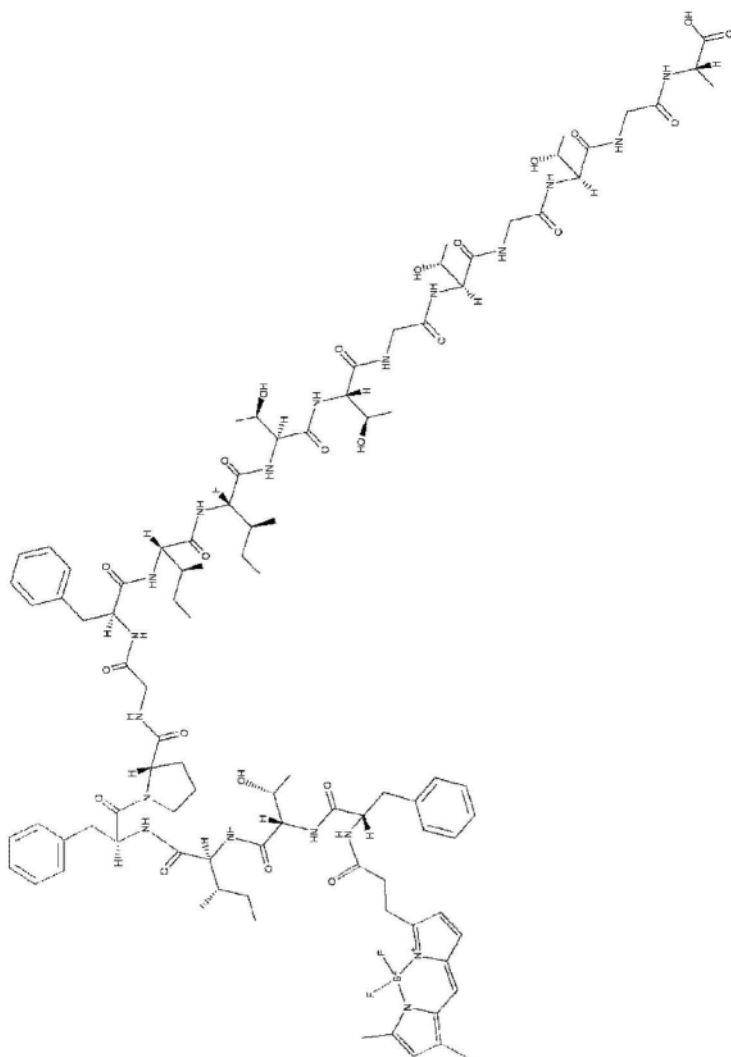
[0952] 向树脂加入TFE/DCM(1:1、v/v、2mL)振荡1小时,进行肽从树脂的切出。反应结束后,通过用合成用柱过滤管内的溶液除去树脂,用TFE/DCM(1:1、v/v、1mL)洗涤树脂2次。混合全部提取液,加入DMF(2mL)后,减压下浓缩。将得到的残渣溶解于NMP(1mL),在室温加入4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茚烯-3-丙酸N-琥珀酰亚胺酯(5mg、0.013mmol),搅拌19小时后,将反应液通过反相硅胶柱色谱(0.1%FA MeCN/H₂O),减压下浓缩包含中间体的级分。将得到的残渣溶解于DCM(2mL)中的5%TFA,在室温搅拌2小时。减压下浓缩反应液后,将得到的残渣用反相硅胶柱色谱(0.1%FA MeCN/H₂O)纯化,得到标题化合物(LCT-67)(13mg)。LCT-67的氨基酸序列示于序列编号:223。

[0953] LCMS(ESI) m/z=1751.2(M-H)⁻

[0954] 保留时间:0.97分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0955] 实施例4.作为LC/MS的标准品应用的N末端具有BdpFL的肽(LCT-12)的合成

[0956]



[0957] 应用负载Fmoc-Ala-OH的2-氯三苯甲基树脂(100mg),应用作为Fmoc氨基酸的Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr (THP) -OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH,用肽合成仪进行肽的延伸(关于氨基酸的缩写在本说明书中另外记载)。按照通过Fmoc法的肽合成法,进行肽的延伸(W02013100132B2)。肽的延伸后,在肽合成仪上进行N末端的Fmoc基的除去后,用DCM洗涤树脂。

[0958] 向树脂加入TFE/DCM(1:1、v/v、2mL)振荡1小时,进行肽从树脂的切出。反应结束后,通过用合成用柱过滤管内的溶液除去树脂,用TFE/DCM(1:1、v/v、1mL)洗涤树脂2次。混合全部提取液,加入DMF(2mL)后,减压下浓缩。将得到的残渣溶解于NMP(0.5mL),将其中的1/4(125μL)在下一反应中使用。在室温向肽的NMP溶液加入配制为76.5mM的BdpFL琥珀酰亚胺酯(140μL),在40℃搅拌过夜后,减压下浓缩。将得到的残渣溶解于HFIP中的0.05M四甲基硫酸氢铵(1.2mL,0.060mmol),在室温搅拌2小时。用反相硅胶柱色谱(0.1%FA MeCN/H₂O)纯化反应液,得到标题化合物(LCT-12)(0.3mg)。LCT-12的氨基酸序列示于序列编号:222。

[0959] LCMS (ESI) $m/z = 1972.9$ (M-H) -

[0960] 保留时间:0.74分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0961] 实施例5. 氨酰tRNA的合成

[0962] 从模板DNA(序列编号:1(D-1)~序列编号:34(D-34)、序列编号:35(D-76)~序列

编号:37 (D-78) 和序列编号:224 (D-82) ~序列编号:241 (D-99)),应用T7 RNA聚合酶通过体外转录反应,合成tRNA (序列编号:38 (TR-1) ~序列编号:74 (TR-37) 和序列编号:242 (TR-38) ~序列编号:259 (TR-55)),通过RNeasy kit (Qiagen公司) 纯化。

[0963] 模板DNA序列编号:1 (D-1)

[0964] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTAAGACGGCGGTAAC

[0965]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0966] 模板DNA序列编号:2 (D-2)

[0967] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTAGACGGCGGTAAC

[0968]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0969] 模板DNA序列编号:3 (D-3)

[0970] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCAGACGGCGGTAAC

[0971]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0972] 模板DNA序列编号:4 (D-4)

[0973] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTAACACGGCGGTAAC

[0974]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0975] 模板DNA序列编号:5 (D-5)

[0976] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTACACGGCGGTAAC

[0977]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0978] 模板DNA序列编号:6 (D-6)

[0979] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTCACGGCGGTAAC

[0980]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0981] 模板DNA序列编号:7 (D-7)

[0982] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTATGACGGCGGTAAC

[0983]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0984] 模板DNA序列编号:8 (D-8)

[0985] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTTGACGGCGGTAAC

[0986]

AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

- [0987] 模板DNA序列编号:9 (D-9)
[0988] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTGACGGCGGTAAC
[0989] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[0990] 模板DNA序列编号:10 (D-10)
[0991] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTATTACGGCGGTAAC
[0992] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[0993] 模板DNA序列编号:11 (D-11)
[0994] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTTTACGGCGGTAAC
[0995] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[0996] 模板DNA序列编号:12 (D-12)
[0997] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTTACGGCGGTAAC
[0998] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[0999] 模板DNA序列编号:13 (D-13)
[1000] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTATCACGGCGGTAAC
[1001] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[1002] 模板DNA序列编号:14 (D-14)
[1003] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTTTACGGCGGTAAC
[1004] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[1005] 模板DNA序列编号:15 (D-15)
[1006] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTCACGGCGGTAAC
[1007] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[1008] 模板DNA序列编号:16 (D-16)
[1009] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTAAAACGGCGGTAAC
[1010] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
[1011] 模板DNA序列编号:17 (D-17)
[1012] DNA序列:

- [1013] GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTAAACGGCGGTAAC
AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1014] 模板DNA序列编号:18 (D-18)
- [1015] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCAAACGGCGGTAAC
- [1016] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1017] 模板DNA序列编号:19 (D-19) DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTACTACGGCGGTAAC
- [1018] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1019] 模板DNA序列编号:20 (D-20)
- [1020] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTCTACGGCGGTAAC
- [1021] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1022] 模板DNA序列编号:21 (D-21)
- [1023] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCCTACGGCGGTAAC
- [1024] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1025] 模板DNA序列编号:22 (D-22)
- [1026] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGCAACGGCGGTAAC
- [1027] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1028] 模板DNA序列编号:23 (D-23)
- [1029] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTCAACGGCGGTAAC
- [1030] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1031] 模板DNA序列编号:24 (D-24)
- [1032] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCCAACGGCGGTAAC
- [1033] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1034] 模板DNA序列编号:25 (D-25)
- [1035] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGGCGGGGTGGAGCAGCCTGGTAGCTCGTCGGGCTCATAACCCGAAGAT
- [1036] CGTCGGTTCAAATCCGGCCCCCGCAA
- [1037] 模板DNA序列编号:26 (D-26)
- [1038] DNA序列:

- [1039] GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGTGACGGCGGTAAC
AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1040] 模板DNA序列编号:27 (D-27)
- [1041] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGTTACGGCGGTAAC
- [1042] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1043] 模板DNA序列编号:28 (D-28)
- [1044] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGTCACGGCGGTAAC
- [1045] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1046] 模板DNA序列编号:29 (D-29)
- [1047] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGAAACGGCGGTAAC
- [1048] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1049] 模板DNA序列编号:30 (D-30)
- [1050] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGCTACGGCGGTAAC
- [1051] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1052] 模板DNA序列编号:31 (D-31)
- [1053] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTGAACGGCGGTAAC
- [1054] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1055] 模板DNA序列编号:32 (D-32)
- [1056] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTGTACGGCGGTAAC
- [1057] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1058] 模板DNA序列编号:33 (D-33)
- [1059] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTATACGGCGGTAAC
- [1060] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1061] 模板DNA序列编号:34 (D-34)
- [1062] DNA序列:
GGCCTAATACGACTCACTATAGGCCCTTAGCTCAGTGGTTAGAGCAGGCGACTTATAATCGCTTGGTC
- [1063] GCTGGTTCAAGTCCAGCAGGGGCCAC
- [1064] 模板DNA序列编号:35 (D-76)

- [1065] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTGCGACGGCGGTAAC
- [1066] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1067] 模板DNA序列编号:36 (D-77)
- [1068] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTTCGACGGCGGTAAC
- [1069] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1070] 模板DNA序列编号:37 (D-78)
- [1071] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTCCGACGGCGGTAAC
- [1072] AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC
- [1073] 模板DNA序列编号:224 (D-82)
- [1074] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTAUGACGCAGGGGGT
- [1075] CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1076] 模板DNA序列编号:225 (D-83)
- [1077] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTAUGATGCAGGGGGT
- [1078] CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1079] 模板DNA序列编号:226 (D-84)
- [1080] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTGUGACGCAGGGGGT
- [1081] CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1082] 模板DNA序列编号:227 (D-85)
- [1083] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTGUGATGCAGGGGGT
- [1084] CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1085] 模板DNA序列编号:228 (D-86)
- [1086] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTUUGACGCAGGGGGT
- [1087] CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1088] 模板DNA序列编号:229 (D-87)
- [1089] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTUUGATGCAGGGGGT
- [1090] CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

- [1091] 模板DNA序列编号:230 (D-88)
- [1092] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTCUGACGCAGGGGGT
- [1093] CGCGGGTTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1094] 模板DNA序列编号:231 (D-89)
- [1095] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTCUGATGCAGGGGGT
- [1096] CGCGGGTTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1097] 模板DNA序列编号:232 (D-90)
- [1098] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTAUCACGCAGGGGGT
- [1099] CGCGGGTTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1100] 模板DNA序列编号:233 (D-91)
- [1101] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTUUCACGCAGGGGGT
- [1102] CGCGGGTTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1103] 模板DNA序列编号:234 (D-92)
- [1104] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTCUCACGCAGGGGGT
- [1105] CGCGGGTTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC
- [1106] 模板DNA序列编号:235 (D-93)
- [1107] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTATGATTCCGTATGTC
- [1108] ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC
- [1109] 模板DNA序列编号:236 (D-94)
- [1110] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTGTGATTCCGTATGTC
- [1111] ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC
- [1112] 模板DNA序列编号:237 (D-95)
- [1113] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTTTGATTCCGTATGTC
- [1114] ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC
- [1115] 模板DNA序列编号:238 (D-96)
- [1116] DNA序列:

- [1117] GGCCTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTCTGATTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC
- [1118] 模板DNA序列编号:239 (D-97)
- [1119] DNA序列:
- [1120] GGCCTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTATCACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC
- [1121] 模板DNA序列编号:240 (D-98)
- [1122] DNA序列:
- [1123] GGCCTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTTTCACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC
- [1124] 模板DNA序列编号:241 (D-99)
- [1125] DNA序列:
- [1126] GGCCTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTCTCACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC
- [1127] tRNA序列编号:38 (TR-1)
- [1128] tRNA (Glu) aag-CA RNA序列:
- [1129] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1130] tRNA序列编号:39 (TR-2)
- [1131] tRNA (Glu) uag-CA RNA序列:
- [1132] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1133] tRNA序列编号:40 (TR-3)
- [1134] tRNA (Glu) cag-CA RNA序列:
- [1135] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1136] tRNA序列编号:41 (TR-4)
- [1137] tRNA (Glu) aac-CA RNA序列:
- [1138] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1139] tRNA序列编号:42 (TR-5)
- [1140] tRNA (Glu) uac-CA RNA序列:
- [1141] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1142] tRNA序列编号:43 (TR-6)

- [1143] tRNA (Glu) cac-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUACACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1144] GACGC
- [1145] tRNA序列编号:44 (TR-7)
- [1146] tRNA (Glu) aug-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAUGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1147] GACGC
- [1148] tRNA序列编号:45 (TR-8)
- [1149] tRNA (Glu) uug-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1150] GACGC
- [1151] tRNA序列编号:46 (TR-9)
- [1152] tRNA (Glu) cug-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1153] GACGC
- [1154] tRNA序列编号:47 (TR-10)
- [1155] tRNA (Glu) auu-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAUUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1156] GACGC
- [1157] tRNA序列编号:48 (TR-11)
- [1158] tRNA (Glu) uuu-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1159] GACGC
- [1160] tRNA序列编号:49 (TR-12)
- [1161] tRNA (Glu) cuu-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUCACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1162] GACGC
- [1163] tRNA序列编号:50 (TR-13)
- [1164] tRNA (Glu) auc-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAUCACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1165] GACGC
- [1166] tRNA序列编号:51 (TR-14)
- [1167] tRNA (Glu) uuc-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUCACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1168] GACGC

- [1169] tRNA序列编号:52 (TR-15)
[1170] tRNA (Glu) cuc-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUCUCACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1171] GACGC
[1172] tRNA序列编号:53 (TR-16)
[1173] tRNA (Glu) aaa-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUAAAACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1174] GACGC
[1175] tRNA序列编号:54 (TR-17)
[1176] tRNA (Glu) uaa-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUAAAACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1177] GACGC
[1178] tRNA序列编号:55 (TR-18)
[1179] tRNA (Glu) caa-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1180] GACGC
[1181] tRNA序列编号:56 (TR-19)
[1182] tRNA (Glu) acu-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUACUACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1183] GACGC
[1184] tRNA序列编号:57 (TR-20)
[1185] tRNA (Glu) ucu-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCUACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1186] GACGC
[1187] tRNA序列编号:58 (TR-21)
[1188] tRNA (Glu) ccu-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCCUACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1189] GACGC
[1190] tRNA序列编号:59 (TR-22)
[1191] tRNA (Glu) gca-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGCAACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
[1192] GACGC
[1193] tRNA序列编号:60 (TR-23)
[1194] tRNA (Glu) uca-CA RNA序列:

- [1195] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1196] tRNA序列编号:61 (TR-24)
- [1197] tRNA (Glu) cca-CA RNA序列:
- [1198] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCCAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1199] tRNA序列编号:62 (TR-25)
- [1200] tRNA (fMet) cau-CA RNA序列:
- [1201] GGGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAUAACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCC
CGCAA
- [1202] tRNA序列编号:63 (TR-26)
- [1203] tRNA (Glu) gu9-CA RNA序列:
- [1204] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGUGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1205] tRNA序列编号:64 (TR-27)
- [1206] tRNA (Glu) guu-CA RNA序列:
- [1207] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGUUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1208] tRNA序列编号:65 (TR-28)
- [1209] tRNA (Glu) guc-CA RNA序列:
- [1210] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGUCACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1211] tRNA序列编号:66 (T R-29)
- [1212] tRNA (Glu) gaa-CA RNA序列:
- [1213] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGAAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1214] tRNA序列编号:67 (TR-30)
- [1215] tRNA (Glu) gcu-CA RNA序列:
- [1216] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGCUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1217] tRNA序列编号:68 (T R-31)
- [1218] tRNA (Glu) uga-CA RNA序列:
- [1219] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUGAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC
- [1220] tRNA序列编号:69 (TR-32)

- [1221] tRNA (Glu) ugu-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1222] GACGC
- [1223] tRNA序列编号:70 (TR-33)
- [1224] tRNA (Glu) uau-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUAUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1225] GACGC
- [1226] tRNA序列编号:71 (TR-34)
- [1227] tRNA (Ile) uau-CA RNA序列:
GGCCCCUAGCUCAGUGGUUAGAGCAGGCGACUUAUAAUCGCUUGGUCGCGUGGUUCAAGUCCAGCAGGG
- [1228] GCCAC
- [1229] tRNA序列编号:72 (T R-35)
- [1230] tRNA (Glu) gcg-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGCGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1231] GACGC
- [1232] tRNA序列编号:73 (T R-36)
- [1233] tRNA (Glu) ucg-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1234] GACGC
- [1235] tRNA序列编号:74 (TR-37)
- [1236] tRNA (Glu) ccg-CA RNA序列:
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCCGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
- [1237] GACGC
- [1238] tRNA序列编号:242 (T R-38)
- [1239] tRNA (Asp) aug-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUAUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1240] UUCCGC
- [1241] tRNA序列编号:243 (TR-39)
- [1242] tRNA (Asp) ccg-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUAUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1243] UUCCGC
- [1244] tRNA序列编号:244 (TR-40)
- [1245] tRNA (Asp) gug-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUGUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1246] UUCCGC

- [1247] tRNA序列编号:245 (TR-41)
- [1248] tRNA (Asp) gug-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUGUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1249] UUCCGC
- [1250] tRNA序列编号:246 (TR-42)
- [1251] tRNA (Asp) uug-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUUUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1252] UUCCGC
- [1253] tRNA序列编号:247 (TR-43)
- [1254] tRNA (Asp) uug-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUUUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1255] UUCCGC
- [1256] tRNA序列编号:248 (TR-44)
- [1257] tRNA (Asp) cug-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUCUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1258] UUCCGC
- [1259] tRNA序列编号:249 (TR-45)
- [1260] tRNA (Asp) cug-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUCUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1261] UUCCGC
- [1262] tRNA序列编号:250 (TR-46)
- [1263] tRNA (Asp) auc-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUAUCACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1264] UUCCGC
- [1265] tRNA序列编号:251 (TR-47)
- [1266] tRNA (Asp) uuc-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUUUCACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1267] UUCCGC
- [1268] tRNA序列编号:252 (TR-48)
- [1269] tRNA (Asp) cuc-CA RNA序列:
GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUCUCACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
- [1270] UUCCGC
- [1271] tRNA序列编号:253 (TR-49)
- [1272] tRNA (AsnE2) aug-CA RNA序列:

- [1273] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUAUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC
- [1274] tRNA序列编号:254 (TR-50)
- [1275] tRNA (AsnE2) gu9-CA RNA序列:
- [1276] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUGUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC
- [1277] tRNA序列编号:255 (TR-51)
- [1278] tRNA (AsnE2) uug-CA RNA序列:
- [1279] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUUUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC
- [1280] tRNA序列编号:256 (TR-52)
- [1281] tRNA (AsnE2) cug-CA RNA序列:
- [1282] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUCUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC
- [1283] tRNA序列编号:257 (TR-53)
- [1284] tRNA (AsnE2) auc-CA RNA序列:
- [1285] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUAUCACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC
- [1286] tRNA序列编号:258 (TR-54)
- [1287] tRNA (AsnE2) uuc-CA RNA序列:
- [1288] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUUUCACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC
- [1289] tRNA序列编号:259 (TR-55)
- [1290] tRNA (AsnE2) cuc-CA RNA序列:
- [1291] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUCUCACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[1292] 应用氨酰pCpA的氨酰tRNA混合液的配制

[1293] 为了配制化合物AA_tR-1,配制用无核酸酶水稀释的反应液,使得成为25μM转录tRNA (Glu) aag-CA (序列编号:38 (TR-1))、50mM HEPES-KOH pH7.5、20mM MgCl₂、1mM ATP、0.6单位/μl T4 RNA连接酶(New england bio lab.公司)、0.25mM氨酰化pCpA (用专利记载(WO2018143145A1)的方法合成的WO2018143145A1中记载的化合物ts14的DMSO溶液),在15℃进行连接反应45分钟。但是,加入T4 RNA连接酶和氨酰化pCpA前的反应液在95℃加热2分钟后,在室温放置5分钟,预先进行tRNA的重折叠。另外,以下从“ts”或“TS”起始的氨酰化pCpA全部是用WO2018143145A1中记载的方法合成的WO2018143145A1中记载的化合物。

[1294] 同样地,为了配制化合物AA_tR-2,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA

(Glu) uag-CA (序列编号:39 (TR-2)) 的连接反应。

[1295] 同样地,为了配制化合物AA_tR-3,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) cag-CA (序列编号:40 (TR-3)) 的连接反应。

[1296] 同样地,为了配制化合物AA_tR-4,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) aac-CA (序列编号:41 (TR-4)) 的连接反应。

[1297] 同样地,为了配制化合物AA_tR-5,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Glu) uac-CA (序列编号:42 (TR-5)) 的连接反应。

[1298] 同样地,为了配制化合物AA_tR-6,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) cac-CA (序列编号:43 (TR-6)) 的连接反应。

[1299] 同样地,为了配制化合物AA_tR-7,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) aug-CA (序列编号:44 (TR-7)) 的连接反应。

[1300] 同样地,为了配制化合物AA_tR-8,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Glu) uug-CA (序列编号:45 (TR-8)) 的连接反应。

[1301] 同样地,为了配制化合物AA_tR-9,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) cug-CA (序列编号:46 (TR-9)) 的连接反应。

[1302] 同样地,为了配制化合物AA_tR-10,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) auu-CA (序列编号:47 (TR-10)) 的连接反应。

[1303] 同样地,为了配制化合物AA_tR-11,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Glu) uuu-CA (序列编号:48 (TR-11)) 的连接反应。

[1304] 同样地,为了配制化合物AA_tR-12,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) cuu-CA (序列编号:49 (TR-12)) 的连接反应。

[1305] 同样地,为了配制化合物AA_tR-13,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) auc-CA (序列编号:50 (TR-13)) 的连接反应。

[1306] 同样地,为了配制化合物AA_tR-14,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Glu) uuc-CA (序列编号:51 (TR-14)) 的连接反应。

[1307] 同样地,为了配制化合物AA_tR-15,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) cuc-CA (序列编号:52 (TR-15)) 的连接反应。

[1308] 同样地,为了配制化合物AA_tR-16,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) aaa-CA (序列编号:53 (TR-16)) 的连接反应。

[1309] 同样地,为了配制化合物AA_tR-17,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Glu) uaa-CA (序列编号:54 (TR-17)) 的连接反应。

[1310] 同样地,为了配制化合物AA_tR-18,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) caa-CA (序列编号:55 (TR-18)) 的连接反应。

[1311] 同样地,为了配制化合物AA_tR-19,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) acu-CA (序列编号:56 (TR-19)) 的连接反应。

[1312] 同样地,为了配制化合物AA_tR-20,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Glu) ucu-CA (序列编号:57 (TR-20)) 的连接反应。

[1313] 同样地,为了配制化合物AA_tR-21,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) ccu-CA (序列编号:58 (TR-21)) 的连接反应。

- [1314] 同样地,为了配制化合物AAtR-22,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) gca-CA (序列编号:59 (TR-22)) 的连接反应。
- [1315] 同样地,为了配制化合物AAtR-23,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Glu) uca-CA (序列编号:60 (TR-23)) 的连接反应。
- [1316] 同样地,为了配制化合物AAtR-24,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) cca-CA (序列编号:61 (TR-24)) 的连接反应。
- [1317] 同样地,为了配制化合物AAtR-26,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) gug-CA (序列编号:63 (TR-26)) 的连接反应。
- [1318] 同样地,为了配制化合物AAtR-27,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) guu-CA (序列编号:64 (TR-27)) 的连接反应。
- [1319] 同样地,为了配制化合物AAtR-28,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) gcu-CA (序列编号:67 (TR-30)) 的连接反应。
- [1320] 同样地,为了配制化合物AAtR-29,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) aug-CA (序列编号:44 (TR-7)) 的连接反应。
- [1321] 同样地,为了配制化合物AAtR-30,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (Glu) uug-CA (序列编号:45 (TR-8)) 的连接反应。
- [1322] 同样地,为了配制化合物AAtR-31,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (Glu) cug-CA (序列编号:46 (TR-9)) 的连接反应。
- [1323] 同样地,为了配制化合物AAtR-32,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) auu-CA (序列编号:47 (TR-10)) 的连接反应。
- [1324] 同样地,为了配制化合物AAtR-33,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (Glu) uuu-CA (序列编号:48 (TR-11)) 的连接反应。
- [1325] 同样地,为了配制化合物AAtR-34,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (Glu) cuu-CA (序列编号:49 (TR-12)) 的连接反应。
- [1326] 同样地,为了配制化合物AAtR-35,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) auc-CA (序列编号:50 (TR-13)) 的连接反应。
- [1327] 同样地,为了配制化合物AAtR-36,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (Glu) uuc-CA (序列编号:51 (TR-14)) 的连接反应。
- [1328] 同样地,为了配制化合物AAtR-37,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (Glu) cuc-CA (序列编号:52 (TR-15)) 的连接反应。
- [1329] 同样地,为了配制化合物AAtR-38,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) aaa-CA (序列编号:53 (TR-16)) 的连接反应。
- [1330] 同样地,为了配制化合物AAtR-39,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (Glu) uaa-CA (序列编号:54 (TR-17)) 的连接反应。
- [1331] 同样地,为了配制化合物AAtR-40,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (Glu) caa-CA (序列编号:55 (TR-18)) 的连接反应。
- [1332] 同样地,为了配制化合物AAtR-41,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) acu-CA (序列编号:56 (TR-19)) 的连接反应。
- [1333] 同样地,为了配制化合物AAtR-42,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA

(Glu) ucu-CA (序列编号:57 (TR-20)) 的连接反应。

[1334] 同样地,为了配制化合物AA_tR-43,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (Glu) ccu-CA (序列编号:58 (TR-21)) 的连接反应。

[1335] 同样地,为了配制化合物AA_tR-44,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) gca-CA (序列编号:59 (TR-22)) 的连接反应。

[1336] 同样地,为了配制化合物AA_tR-45,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (Glu) uca-CA (序列编号:60 (TR-23)) 的连接反应。

[1337] 同样地,为了配制化合物AA_tR-46,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (Glu) cca-CA (序列编号:61 (TR-24)) 的连接反应。

[1338] 同样地,为了配制化合物AA_tR-47,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) gug-CA (序列编号:63 (TR-26)) 的连接反应。

[1339] 同样地,为了配制化合物AA_tR-48,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) guu-CA (序列编号:64 (TR-27)) 的连接反应。

[1340] 同样地,为了配制化合物AA_tR-49,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) guc-CA (序列编号:65 (TR-28)) 的连接反应。

[1341] 同样地,为了配制化合物AA_tR-50,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) gaa-CA (序列编号:66 (TR-29)) 的连接反应。

[1342] 同样地,为了配制化合物AA_tR-51,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (Glu) gcu-CA (序列编号:67 (TR-30)) 的连接反应。

[1343] 同样地,为了配制化合物AA_tR-52,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS16) 对转录tRNA (Glu) uga-CA (序列编号:68 (TR-31)) 的连接反应。

[1344] 同样地,为了配制化合物AA_tR-53,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS16) 对转录tRNA (Glu) ugu-CA (序列编号:69 (TR-32)) 的连接反应。

[1345] 同样地,为了配制化合物AA_tR-54,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS16) 对转录tRNA (Glu) uau-CA (序列编号:70 (TR-33)) 的连接反应。

[1346] 同样地,为了配制化合物AA_tR-55,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS16) 对转录tRNA (Ile) uau-CA (序列编号:71 (TR-34)) 的连接反应。

[1347] 同样地,为了配制化合物AA_tR-56,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS51) 对转录tRNA (Ile) uau-CA (序列编号:71 (TR-34)) 的连接反应。

[1348] 同样地,为了配制化合物AA_tR-57,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Glu) gcg-CA (序列编号:72 (TR-35)) 的连接反应。

[1349] 同样地,为了配制化合物AA_tR-58,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS15) 对转录tRNA (Glu) ucg-CA (序列编号:73 (TR-36)) 的连接反应。

[1350] 同样地,为了配制化合物AA_tR-59,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Glu) ccg-CA (序列编号:74 (TR-37)) 的连接反应。

[1351] 同样地,为了配制化合物AA_tR-60,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Asp) aug-CA (序列编号:242 (TR-38)) 的连接反应。

[1352] 同样地,为了配制化合物AA_tR-61,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Asp) uug-CA (序列编号:246 (TR-42)) 的连接反应。

- [1353] 同样地,为了配制化合物AA_tR-62,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Asp) *cug*-CA (序列编号:248 (TR-44)) 的连接反应。
- [1354] 同样地,为了配制化合物AA_tR-63,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Asp) *aug*-CA (序列编号:243 (TR-39)) 的连接反应。
- [1355] 同样地,为了配制化合物AA_tR-64,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Asp) *uug*-CA (序列编号:247 (TR-43)) 的连接反应。
- [1356] 同样地,为了配制化合物AA_tR-65,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Asp) *cug*-CA (序列编号:249 (TR-45)) 的连接反应。
- [1357] 同样地,为了配制化合物AA_tR-66,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Asp) *gug*-CA (序列编号:244 (TR-40)) 的连接反应。
- [1358] 同样地,为了配制化合物AA_tR-67,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Asp) *uug*-CA (序列编号:246 (TR-42)) 的连接反应。
- [1359] 同样地,为了配制化合物AA_tR-68,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Asp) *cug*-CA (序列编号:248 (TR-44)) 的连接反应。
- [1360] 同样地,为了配制化合物AA_tR-69,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Asp) *gug*-CA (序列编号:245 (TR-41)) 的连接反应。
- [1361] 同样地,为了配制化合物AA_tR-70,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Asp) *uug*-CA (序列编号:247 (TR-43)) 的连接反应。
- [1362] 同样地,为了配制化合物AA_tR-71,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Asp) *cug*-CA (序列编号:249 (TR-45)) 的连接反应。
- [1363] 同样地,为了配制化合物AA_tR-72,用前述方法进行氨酰化pCpA (ts14) 对转录tRNA (Asp) *auc*-CA (序列编号:250 (TR-46)) 的连接反应。
- [1364] 同样地,为了配制化合物AA_tR-73,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS14) 对转录tRNA (Asp) *uuc*-CA (序列编号:251 (TR-47)) 的连接反应。
- [1365] 同样地,为了配制化合物AA_tR-74,用前述方法进行氨酰化pCpA (TS24) 对转录tRNA (Asp) *cuc*-CA (序列编号:252 (TR-48)) 的连接反应。
- [1366] 同样地,为了配制化合物AA_tR-75,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (AsnE2) *aug*-CA (序列编号:253 (TR-49)) 的连接反应。
- [1367] 同样地,为了配制化合物AA_tR-76,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (AsnE2) *uug*-CA (序列编号:255 (TR-51)) 的连接反应。
- [1368] 同样地,为了配制化合物AA_tR-77,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (AsnE2) *cug*-CA (序列编号:256 (TR-52)) 的连接反应。
- [1369] 同样地,为了配制化合物AA_tR-78,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA (AsnE2) *gug*-CA (序列编号:254 (TR-50)) 的连接反应。
- [1370] 同样地,为了配制化合物AA_tR-79,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (AsnE2) *uug*-CA (序列编号:255 (TR-51)) 的连接反应。
- [1371] 同样地,为了配制化合物AA_tR-80,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (AsnE2) *cug*-CA (序列编号:256 (TR-52)) 的连接反应。
- [1372] 同样地,为了配制化合物AA_tR-81,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS48) 对转录tRNA

(AsnE2) auc-CA (序列编号:257 (TR-53)) 的连接反应。

[1373] 同样地,为了配制化合物AA_tR-82,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS49) 对转录tRNA (AsnE2) uuc-CA (序列编号:258 (TR-54)) 的连接反应。

[1374] 同样地,为了配制化合物AA_tR-83,用前述方法进行氨酰化pCpA (SS50) 对转录tRNA (AsnE2) cuc-CA (序列编号:259 (TR-55)) 的连接反应。

[1375] 向各自的连接反应后的溶液加入0.3M乙酸钠后,在加入苯酚·氯仿溶液的阶段,混合各连接产物,以混合物的状态、或单一状态原样,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,回收。

[1376] 具体地,将向化合物AA_tR-1、化合物AA_tR-2、化合物AA_tR-3的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-1、化合物AA_tR-2、化合物AA_tR-3的混合液)。

[1377] 同样地,将向化合物AA_tR-4、化合物AA_tR-5、化合物AA_tR-6的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-4、化合物AA_tR-5、化合物AA_tR-6的混合液)。

[1378] 同样地,将向化合物AA_tR-7、化合物AA_tR-8、化合物AA_tR-9的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-7、化合物AA_tR-8、化合物AA_tR-9的混合液)。

[1379] 同样地,将向化合物AA_tR-10、化合物AA_tR-11、化合物AA_tR-12的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-10、化合物AA_tR-11、化合物AA_tR-12的混合液)。

[1380] 同样地,将向化合物AA_tR-13、化合物AA_tR-14、化合物AA_tR-15的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-13、化合物AA_tR-14、化合物AA_tR-15的混合液)。

[1381] 同样地,将向化合物AA_tR-16、化合物AA_tR-17、化合物AA_tR-18的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-16、化合物AA_tR-17、化合物AA_tR-18的混合液)。

[1382] 同样地,将向化合物AA_tR-19、化合物AA_tR-20、化合物AA_tR-21的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-19、化合物AA_tR-20、化合物AA_tR-21的混合液)。

[1383] 同样地,将向化合物AA_tR-22、化合物AA_tR-23、化合物AA_tR-24的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-22、化合物AA_tR-23、化合物AA_tR-24的混合液)。

[1384] 同样地,将向化合物AA_tR-26、化合物AA_tR-8、化合物AA_tR-9的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-26、化合物AA_tR-8、化合物AA_tR-9的混合液)。

[1385] 同样地,将向化合物AA_tR-27、化合物AA_tR-11、化合物AA_tR-12的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-27、化合物AA_tR-11、化合物AA_tR-12的混合液)。

[1386] 同样地,将向化合物AA_tR-28、化合物AA_tR-20、化合物AA_tR-21的3种连接产物加入

0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-28、化合物AA_tR-20、化合物AA_tR-21的混合液)。

[1387] 同样地,将向化合物AA_tR-29、化合物AA_tR-30、化合物AA_tR-31的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-29、化合物AA_tR-30、化合物AA_tR-31的混合液)。

[1388] 同样地,将向化合物AA_tR-32、化合物AA_tR-33、化合物AA_tR-34的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-32、化合物AA_tR-33、化合物AA_tR-34的混合液)。

[1389] 同样地,将向化合物AA_tR-35、化合物AA_tR-36、化合物AA_tR-37的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-35、化合物AA_tR-36、化合物AA_tR-37的混合液)。

[1390] 同样地,将向化合物AA_tR-38、化合物AA_tR-39、化合物AA_tR-40的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-38、化合物AA_tR-39、化合物AA_tR-40的混合液)。

[1391] 同样地,将向化合物AA_tR-41、化合物AA_tR-42、化合物AA_tR-43的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-41、化合物AA_tR-42、化合物AA_tR-43的混合液)。

[1392] 同样地,将向化合物AA_tR-44、化合物AA_tR-45、化合物AA_tR-46的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-44、化合物AA_tR-45、化合物AA_tR-46的混合液)。

[1393] 同样地,将向化合物AA_tR-47、化合物AA_tR-30、化合物AA_tR-31的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-47、化合物AA_tR-30、化合物AA_tR-31的混合液)。

[1394] 同样地,将向化合物AA_tR-48、化合物AA_tR-33、化合物AA_tR-34的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-48、化合物AA_tR-33、化合物AA_tR-34的混合液)。

[1395] 同样地,将向化合物AA_tR-49、化合物AA_tR-36、化合物AA_tR-37的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-49、化合物AA_tR-36、化合物AA_tR-37的混合液)。

[1396] 同样地,将向化合物AA_tR-50、化合物AA_tR-39、化合物AA_tR-40的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-50、化合物AA_tR-39、化合物AA_tR-40的混合液)。

[1397] 同样地,将向化合物AA_tR-51、化合物AA_tR-42、化合物AA_tR-43的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-51、化合物AA_tR-42、化合物AA_tR-43的混合液)。

[1398] 同样地,将向化合物AA_tR-57、化合物AA_tR-59的2种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-57、化合物AA_tR-59的混合液)。

[1399] 同样地,将向化合物AA_tR-60、化合物AA_tR-61、化合物AA_tR-62的3种连接产物加入

0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-60、化合物AA_tR-61、化合物AA_tR-62的混合液)。

[1400] 同样地,将向化合物AA_tR-63、化合物AA_tR-64、化合物AA_tR-65的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-63、化合物AA_tR-64、化合物AA_tR-65的混合液)。

[1401] 同样地,将向化合物AA_tR-66、化合物AA_tR-67、化合物AA_tR-68的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-66、化合物AA_tR-67、化合物AA_tR-68的混合液)。

[1402] 同样地,将向化合物AA_tR-69、化合物AA_tR-70、化合物AA_tR-71的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-69、化合物AA_tR-70、化合物AA_tR-71的混合液)。

[1403] 同样地,将向化合物AA_tR-72、化合物AA_tR-73、化合物AA_tR-74的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-72、化合物AA_tR-73、化合物AA_tR-74的混合液)。

[1404] 同样地,将向化合物AA_tR-75、化合物AA_tR-76、化合物AA_tR-77的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-75、化合物AA_tR-76、化合物AA_tR-77的混合液)。

[1405] 同样地,将向化合物AA_tR-78、化合物AA_tR-79、化合物AA_tR-80的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-78、化合物AA_tR-79、化合物AA_tR-80的混合液)。

[1406] 同样地,将向化合物AA_tR-81、化合物AA_tR-82、化合物AA_tR-83的3种连接产物加入0.3M乙酸钠、加入苯酚·氯仿溶液的液体等量混合,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制氨酰化tRNA混合液(化合物AA_tR-81、化合物AA_tR-82、化合物AA_tR-83的混合液)。

[1407] 不混合而纯化、配制以下化合物。

[1408] 对向化合物AA_tR-52的连接产物加入乙酸钠成为0.3M、加入苯酚·氯仿溶液的液体,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制化合物AA_tR-52。

[1409] 对向化合物AA_tR-53的连接产物加入乙酸钠成为0.3M、加入苯酚·氯仿溶液的液体,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制化合物AA_tR-53。

[1410] 对向化合物AA_tR-54的连接产物加入乙酸钠成为0.3M、加入苯酚·氯仿溶液的液体,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制化合物AA_tR-54。

[1411] 对向化合物AA_tR-55的连接产物加入乙酸钠成为0.3M、加入苯酚·氯仿溶液的液体,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制化合物AA_tR-55。

[1412] 对向化合物AA_tR-56的连接产物加入乙酸钠成为0.3M、加入苯酚·氯仿溶液的液体,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制化合物AA_tR-56。

[1413] 对向化合物AA_tR-58的连接产物加入乙酸钠成为0.3M、加入苯酚·氯仿溶液的液体,进行苯酚·氯仿提取和乙醇沉淀,配制化合物AA_tR-58。

[1414] 应用氨酰pCpA的起始氨酰tRNA的配制

[1415] 配制用无核酸酶水稀释的反应液,使得成为25μM转录tRNA(fMet) cau-CA(序列编号:62(TR-25)、50mM HEPES-KOH pH7.5、20mM MgCl₂、1mM ATP、0.6单位/μl T4 RNA连接酶

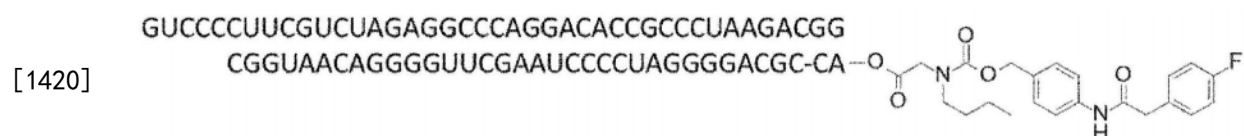
(New england bio lab. 公司)、0.25mM 氨酰化 pCpA (MT01 的 DMSO 溶液), 在 15℃ 进行连接反应 45 分钟。但是, 加入 T4 RNA 连接酶和氨酰化 pCpA 前的反应液在 95℃ 加热 2 分钟后, 在室温放置 5 分钟, 预先进行 tRNA 的重折叠。

[1416] 向连接反应液加入乙酸钠成为 0.3M, 进行苯酚·氯仿提取, 通过乙醇沉淀回收起始氨酰 tRNA (化合物 AAtR-25)。

[1417] 起始氨酰化 tRNA 恰在向翻译混合物添加前溶解于 1mM 乙酸钠。

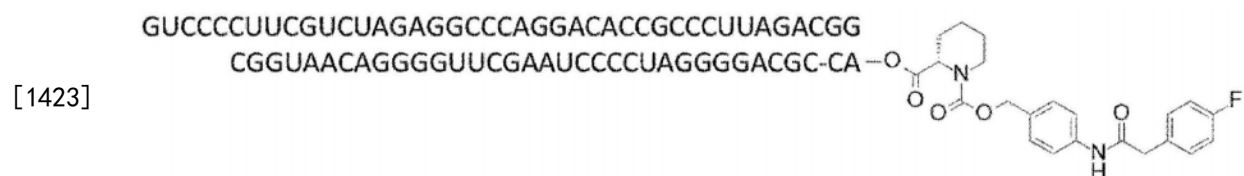
[1418] 化合物 AAtR-1 序列编号: 75

[1419] nBuG-tRNA (Glu) aag



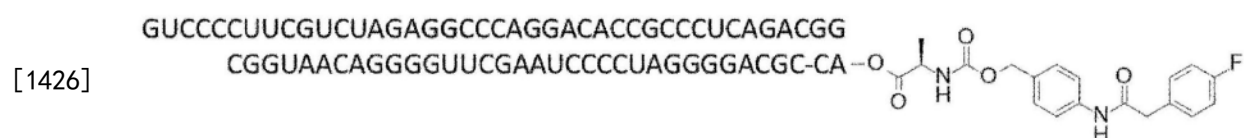
[1421] 化合物 AAtR-2 序列编号: 76

[1422] Pic2-tRNA (Glu) uag



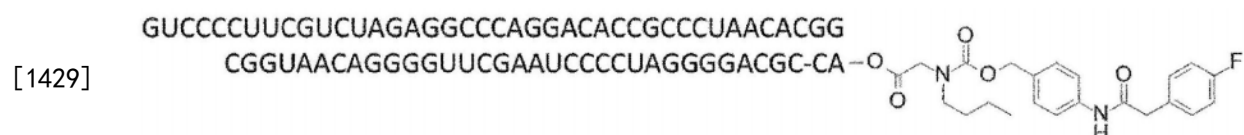
[1424] 化合物 AAtR-3 序列编号: 77

[1425] dA-tRNA (Glu) cag



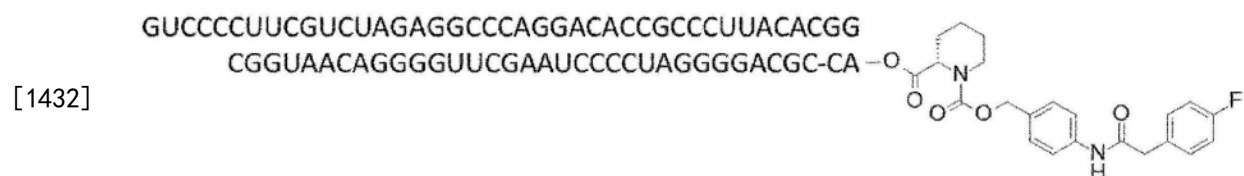
[1427] 化合物 AAtR-4 序列编号: 78

[1428] nBuG-tRNA (Glu) aac



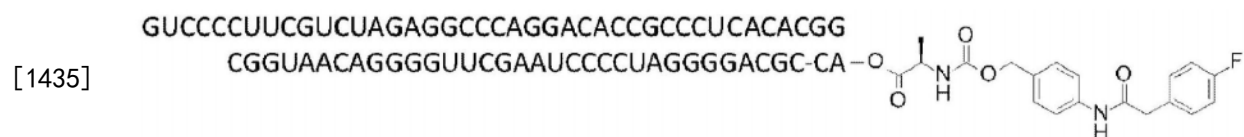
[1430] 化合物 AAtR-5 序列编号: 79

[1431] Pic2-tRNA (Glu) uac



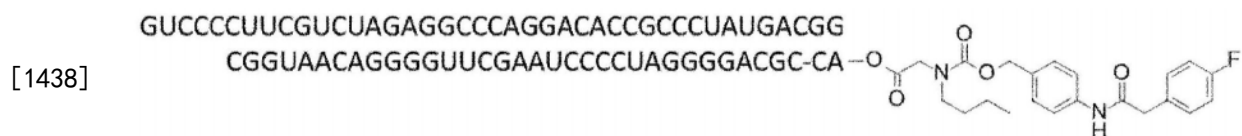
[1433] 化合物 AAtR-6 序列编号: 80

[1434] dA-tRNA (Glu) cac



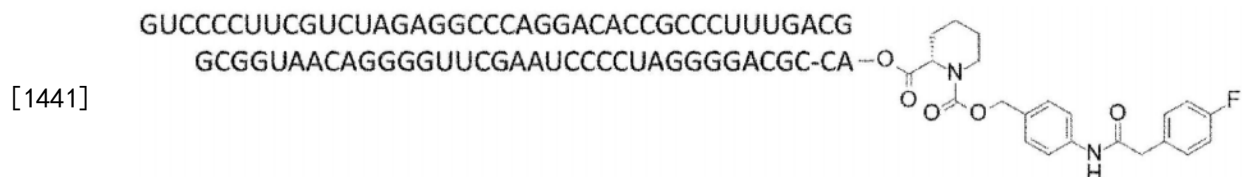
[1436] 化合物AA_tR-7序列编号:81

[1437] nBuG-tRNA (Glu) aug



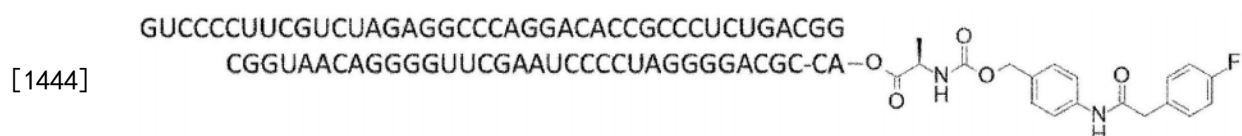
[1439] 化合物AA_tR-8序列编号:82

[1440] Pic2-tRNA (Glu) uug



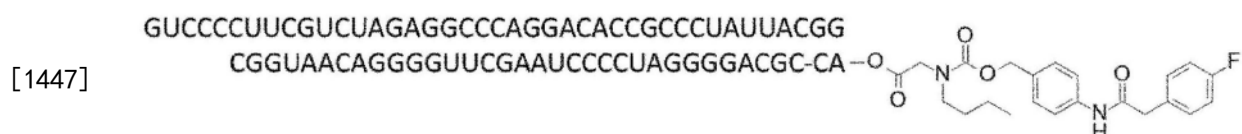
[1442] 化合物AA_tR-9序列编号:83

[1443] dA-tRNA (Glu) cug



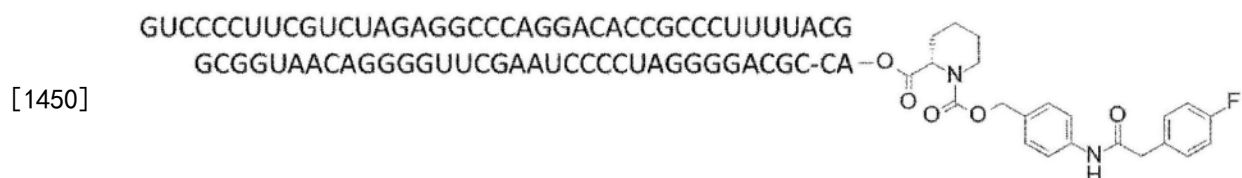
[1445] 化合物AA_tR-10序列编号:84

[1446] nBuG-tRNA (Glu) auu



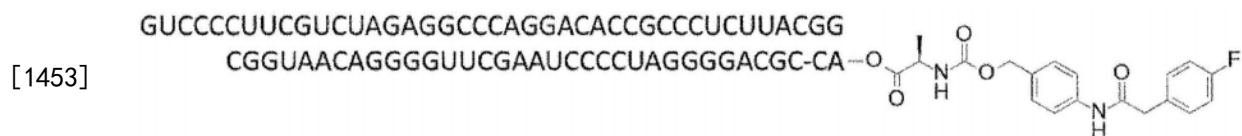
[1448] 化合物AA_tR-11序列编号:85

[1449] Pic2-tRNA (Glu) uuu



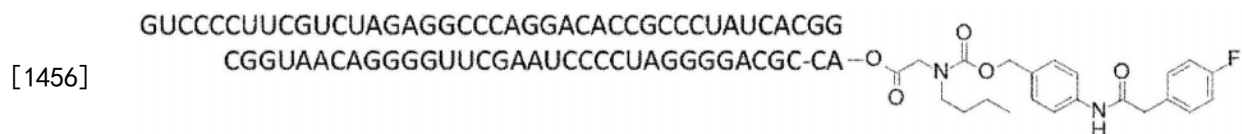
[1451] 化合物AA_tR-12序列编号:86

[1452] dA-tRNA (Glu) cuu



[1454] 化合物AA_tR-13序列编号:87

[1455] nBuG-tRNA (Glu) auc

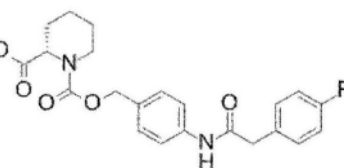


[1457] 化合物AA_tR-14序列编号:88

[1458] Pic₂-tRNA (Glu) uuc

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUCACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

[1459]

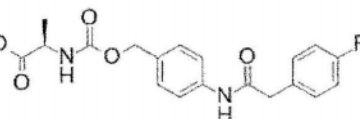


[1460] 化合物AA_tR-15序列编号:89

[1461] dA-tRNA (Glu) cuc

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

[1462]

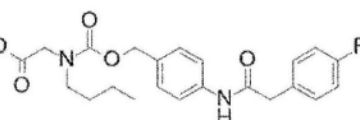


[1463] 化合物AA_tR-16序列编号:90

[1464] nBuG-tRNA (Glu) aaa

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAAACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

[1465]

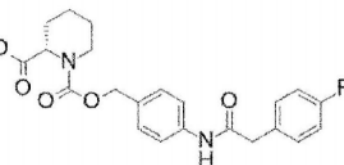


[1466] 化合物AA_tR-17序列编号:91

[1467] Pic₂-tRNA (Glu) uaa

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUAAACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

[1468]

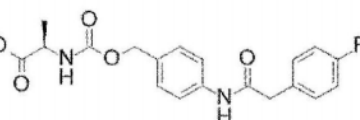


[1469] 化合物AA_tR-18序列编号:92

[1470] dA-tRNA (Glu) caa

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

[1471]

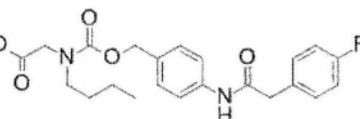


[1472] 化合物AA_tR-19序列编号:93

[1473] nBuG-tRNA (Glu) acu

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUACUACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

[1474]

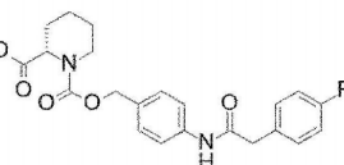


[1475] 化合物AA_tR-20序列编号:94

[1476] Pic₂-tRNA (Glu) ucu

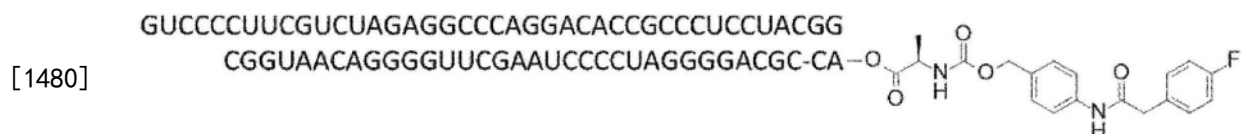
GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCUACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

[1477]



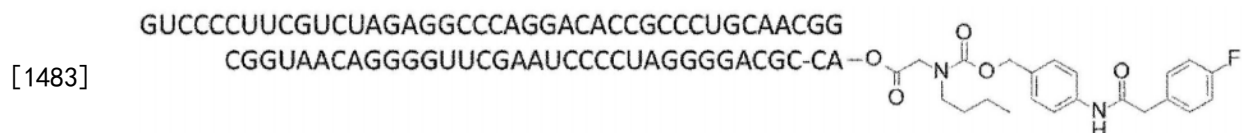
[1478] 化合物AA_tR-21序列编号:95

[1479] dA-tRNA (Glu) ccu



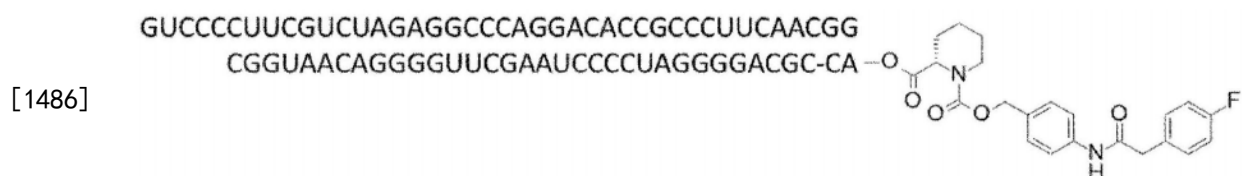
[1481] 化合物AA_tR-22序列编号:96

[1482] nBuG-tRNA (Glu) gca



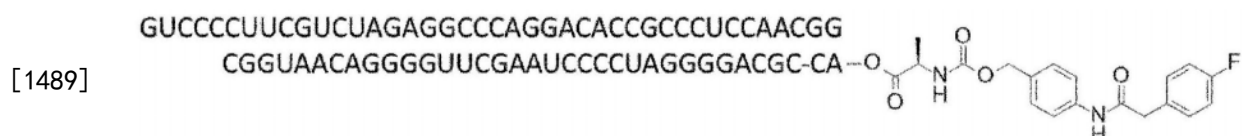
[1484] 化合物AA_tR-23序列编号:97

[1485] Pic2-tRNA (Glu) uca



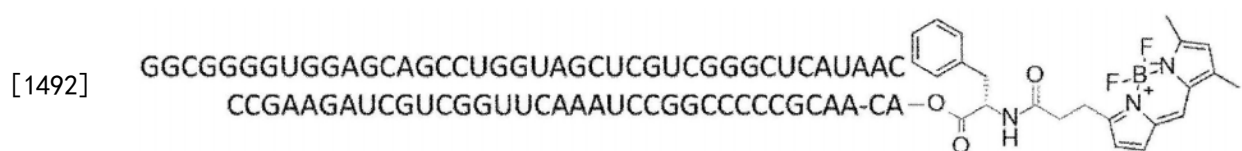
[1487] 化合物AA_tR-24序列编号:98

[1488] dA-tRNA (Glu) cca



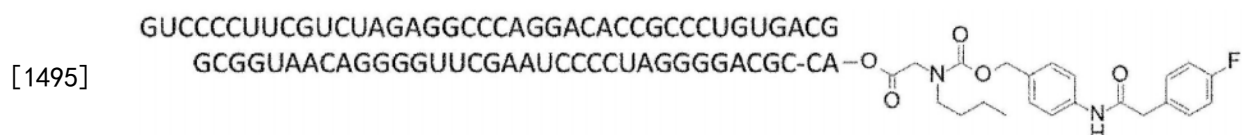
[1490] 化合物AA_tR-25序列编号:99

[1491] BdpFL-Phe-tRNA (fMet) cau



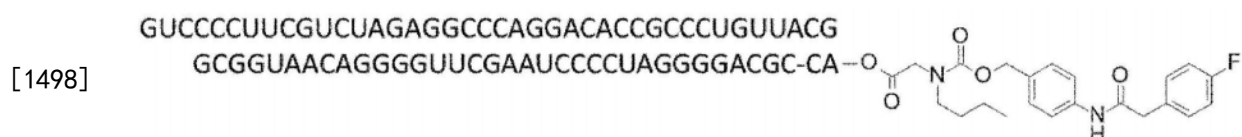
[1493] 化合物AA_tR-26序列编号:100

[1494] nBuG-tRNA (Glu) gug



[1496] 化合物AA_tR-27序列编号:101

[1497] nBuG-tRNA (Glu) guu

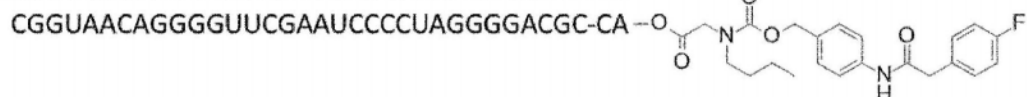


[1499] 化合物AA_tR-28序列编号:102

[1500] nBuG-tRNA (Glu) gcu

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGCUACGG

[1501]

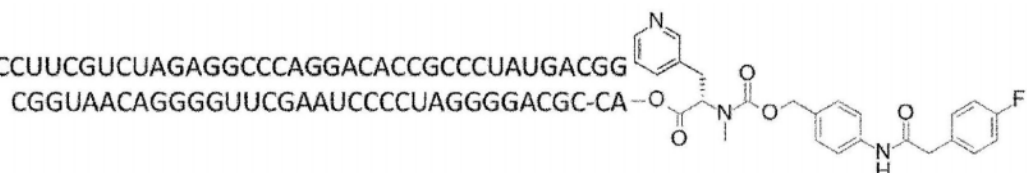


[1502] 化合物AAtR-29序列编号:103

[1503] MeA3Pr-tRNA (Glu) aug

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUAUGACGG

[1504]

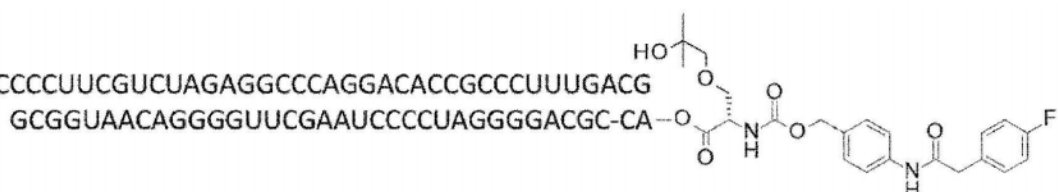


[1505] 化合物AAtR-30序列编号:104

[1506] StBuOH-tRNA (Glu) uug

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUUGACGG

[1507]

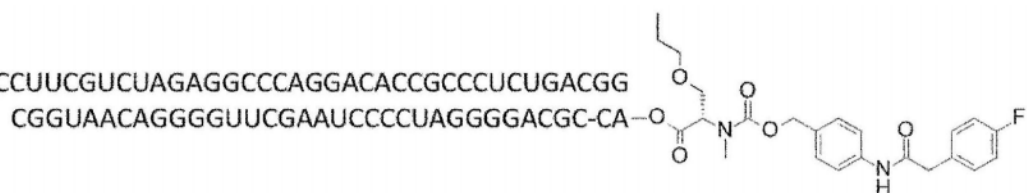


[1508] 化合物AAtR-31序列编号:105

[1509] Me SnPr-tRNA (Glu) cug

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUCUGACGG

[1510]

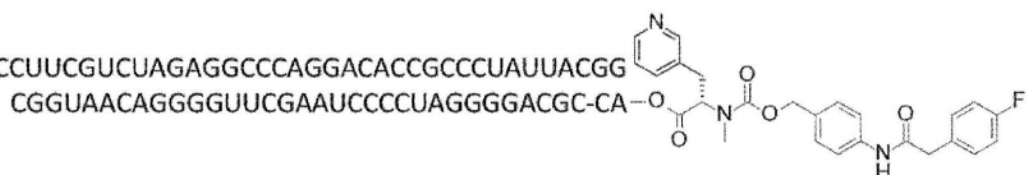


[1511] 化合物AAtR-32序列编号:106

[1512] MeA3Pr-tRNA (Glu) auu

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUAUUACGG

[1513]

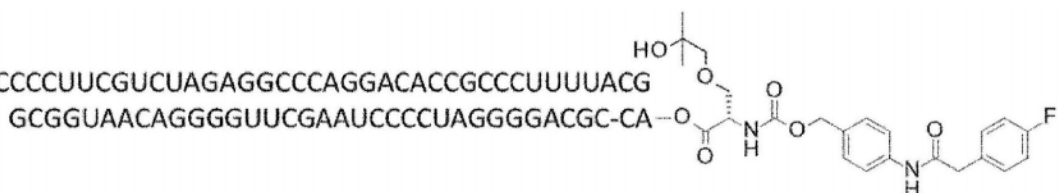


[1514] 化合物AAtR-33序列编号:107

[1515] StBuOH-tRNA (Glu) uuu

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUUUACG

[1516]

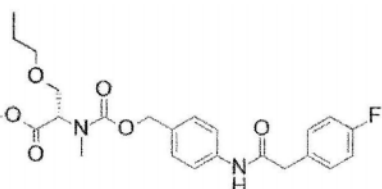


[1517] 化合物AAtR-34序列编号:108

[1518] MeSnPr-tRNA (Glu) cuu

[1519]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUCUACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

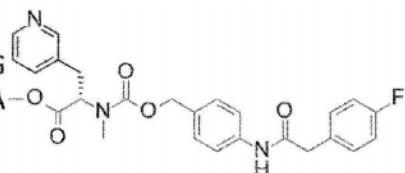


[1520] 化合物AA_tR-35序列编号:109

[1521] MeA3Pr-tRNA (Glu) auc

[1522]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUAUCACGG
CGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

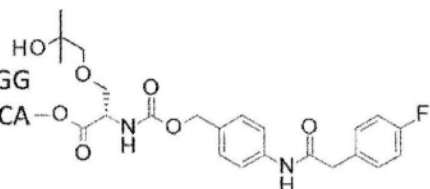


[1523] 化合物AAtR-36序列编号:110

[1524] StBuOH-tRNA (Glu) uuc

[1525]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUCACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

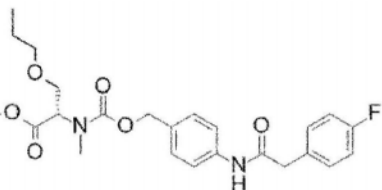


[1526] 化合物AAtR-37序列编号:111

[1527] MeSnPr-tRNA (Glu) cuc

[1528]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCUCACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

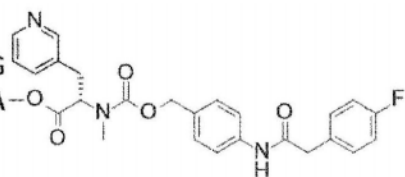


[1529] 化合物AAtR-38序列编号:112

[1530] MeA3Pr-tRNA (Glu) aaa

[1531]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAAACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

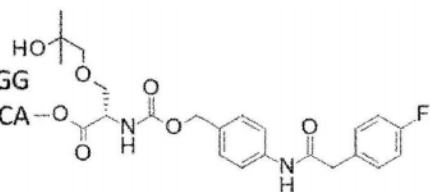


[1532] 化合物AA_tR-39序列编号:113

[1533] StBuOH-tRNA (Glu) uaa

[1534]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUAAACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

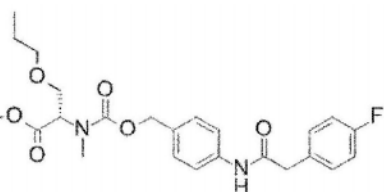


[1535] 化合物AAtR-40序列编号:114

[1536] Me SnPr-tRNA (Glu) caa

[1537]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA



[1538]

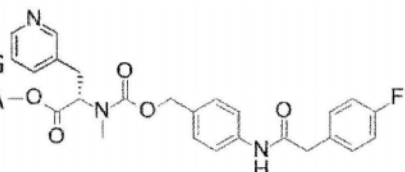
化合物AAtR-41序列编号:115

[1539]

MeA3Pr-tRNA (Glu) acu

[1540]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUACUACGG
CGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA



[1541]

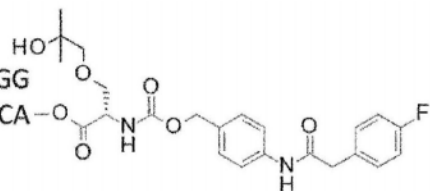
化合物AAtR-42序列编号:116

[1542]

StBuOH-tRNA (Glu) ucu

[1543]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCUACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA



[1544]

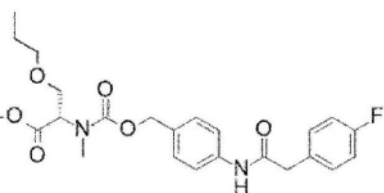
化合物AAtR-43序列编号:117

[1545]

MeSnPr-tRNA (Glu) ccu

[1546]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCCUACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA



[1547]

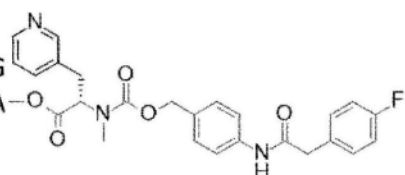
化合物AAtR-44序列编号:118

[1548]

MeA3Pr-tRNA (Glu) gca

[1549]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGCAACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA



[1550]

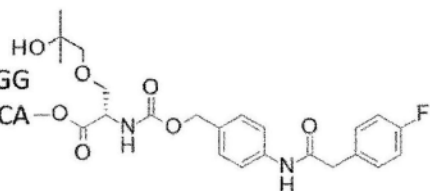
化合物AAtR-45序列编号:119

[1551]

StBuOH-tRNA (Glu) uca

[1552]

GUCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCAACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

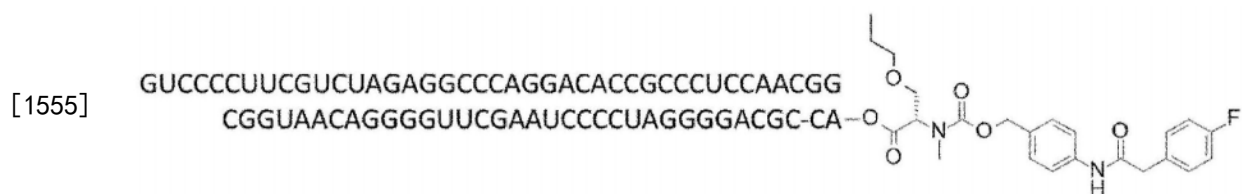


[1553]

化合物AAtR-46序列编号:120

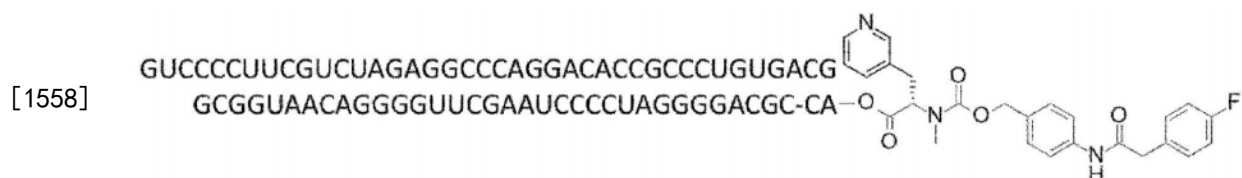
[1554]

MeSnPr-tRNA (Glu) cca



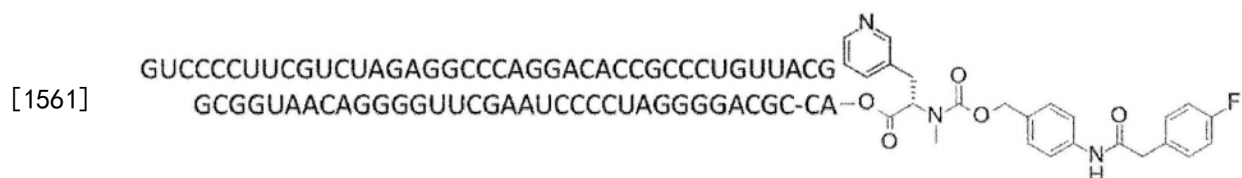
[1556] 化合物AAtR-47序列编号:121

[1557] MeA3Pr-tRNA (Glu) gug



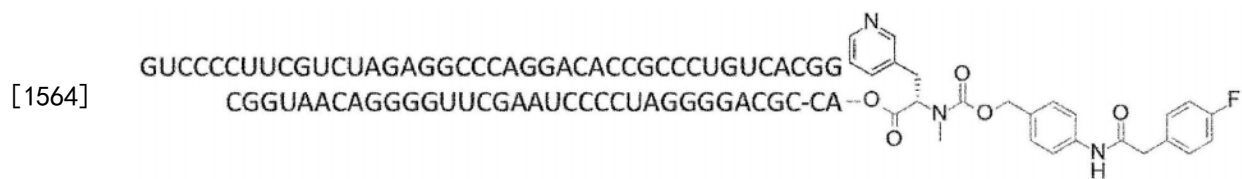
[1559] 化合物AAtR-48序列编号:122

[1560] MeA3Pr-tRNA (Glu) guu



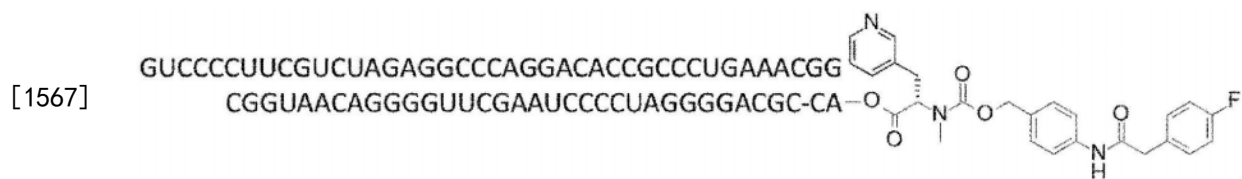
[1562] 化合物AAtR-49序列编号:123

[1563] MeA3Pr-tRNA (Glu) guc



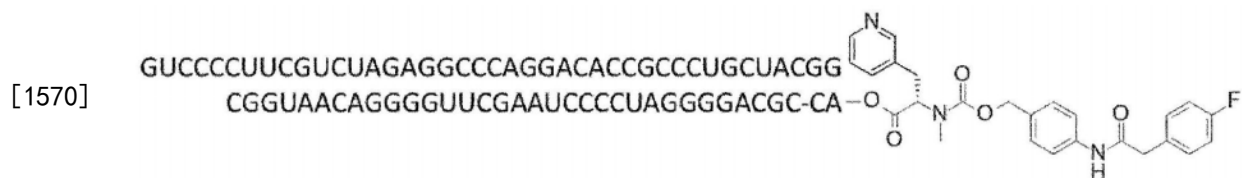
[1565] 化合物AAtR-50序列编号:124

[1566] MeA3Pr-tRNA (Glu) gaa



[1568] 化合物AAtR-51序列编号:125

[1569] MeA3Pr-tRNA (Glu) gcu

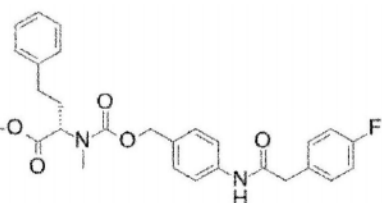


[1571] 化合物AAtR-52序列编号:126

[1572] MeHph-tRNA (Glu) uga

[1573]

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGAACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

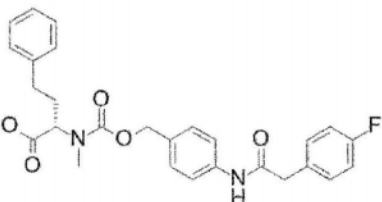


[1574] 化合物AAtR-53序列编号:127

[1575] MeHph-tRNA (Glu) ugu

[1576]

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGUACG
GCGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

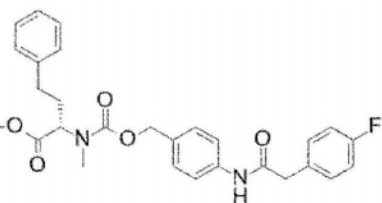


[1577] 化合物AAtR-54序列编号:128

[1578] MeHph-tRNA (Glu) uau

[1579]

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUAUACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

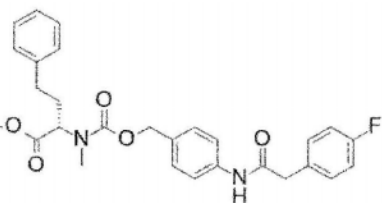


[1580] 化合物AAtR-55序列编号:129

[1581] MeHph-tRNA (Ile2) uau

[1582]

GGCCCUUAGCUCAGUGGUUAGAGCAGGCGACUUAUAAUC
GCUUGGUCGCUGGUUCAAGUCCAGCAGGGGCCAC-CA

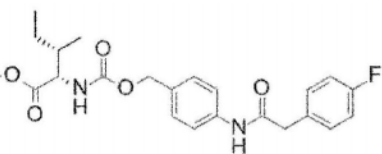


[1583] 化合物AAtR-56序列编号:130

[1584] Ile-tRNA (Ile2) uau

[1585]

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUAUACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA

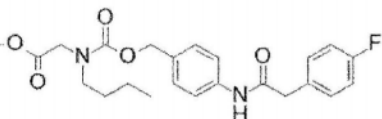


[1586] 化合物AAtR-57序列编号:131

[1587] nBuG-tRNA (Glu) gcg

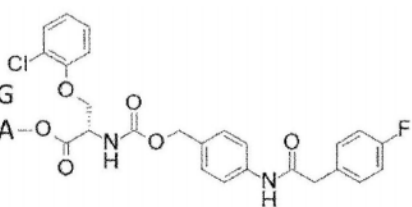
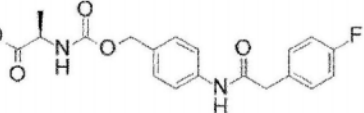
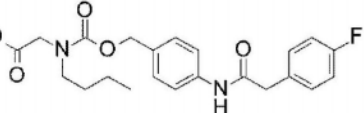
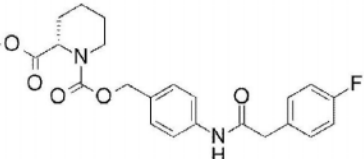
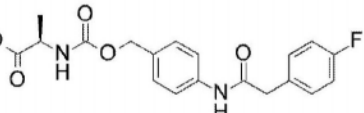
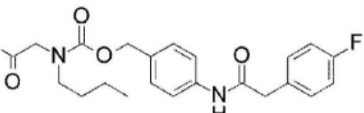
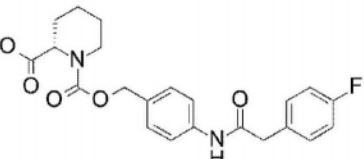
[1588]

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUGCGACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA



[1589] 化合物AAtR-58序列编号:132

[1590] SPh2C1-tRNA (Glu) ucg

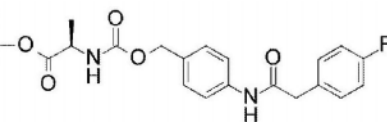
- [1591] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUCGACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA-O-
- [1592] 化合物AAtR-59序列编号:133
- [1593] dA-tRNA (Glu) ccg
- [1594] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUCCGACGG
CGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGGGACGC-CA-O-
- [1595] 化合物AAtR-60序列编号:260
- [1596] nBuGly-tRNA (Asp1) _aug
- [1597] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCUGCCUAUGACG
CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUCCGC-CA-O-
- [1598] 化合物AAtR-61序列编号:261
- [1599] Pic2-tRNA (Asp1) _uug
- [1600] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCUGCCUUUGACG
CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUCCGC-CA-O-
- [1601] 化合物AAtR-62序列编号:262
- [1602] dA-tRNA (Asp1) _cug
- [1603] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCUGCCUCUGACG
CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUCCGC-CA-O-
- [1604] 化合物AAtR-63序列编号:263
- [1605] nBuGly-tRNA (Asp1-ACL7U) _aug
- [1606] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCUGCUUAUGAU
GCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUCCGC-CA-O-
- [1607] 化合物AAtR-64序列编号:264
- [1608] Pic2-tRNA (Asp1-ACL7A) _uug
- [1609] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCUGCUUUUGAU
GCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUCCGC-CA-O-
- [1610] 化合物AAtR-65序列编号:265

[1611] dA-tRNA (Asp1-ACL7G) cug

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUCUGAUG

[1612]

CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC-CA



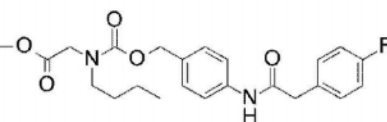
[1613] 化合物AAtR-66序列编号:266

[1614] nBuGly-tRNA (Asp1) _gug

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUGUGACG

[1615]

CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC-CA



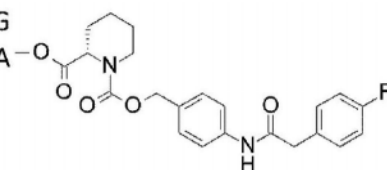
[1616] 化合物AAtR-67序列编号:267

[1617] Pic2-tRNA (Asp1) _uug

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUUUGACG

[1618]

CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC-CA



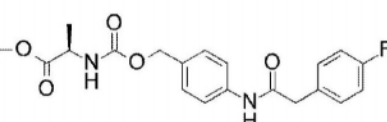
[1619] 化合物AAtR-68序列编号:268

[1620] dA-tRNA (Asp1) _cug

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUCUGACG

[1621]

CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC-CA



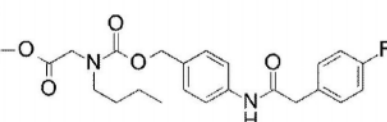
[1622] 化合物AAtR-69序列编号:269

[1623] nBuGly-tRNA (Asp1-ACL7C) _gug

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUGUGAUG

[1624]

CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC-CA



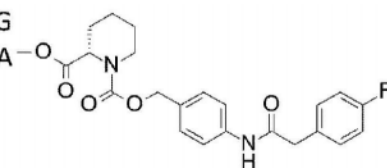
[1625] 化合物AAtR-70序列编号:270

[1626] Pic2-tRNA (Asp1-ACL7A) _uug

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUUUGAUG

[1627]

CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC-CA



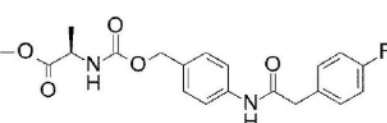
[1628] 化合物AAtR-71序列编号:271

[1629] dA-tRNA (Asp1-ACL7G) cug

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUCUGAUG

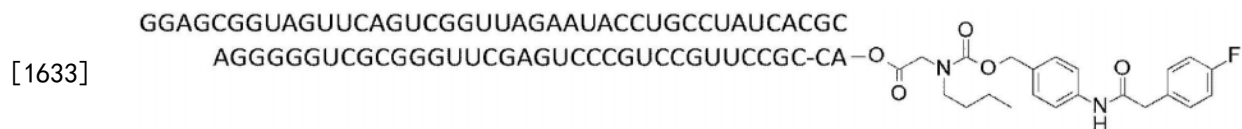
[1630]

CAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC-CA



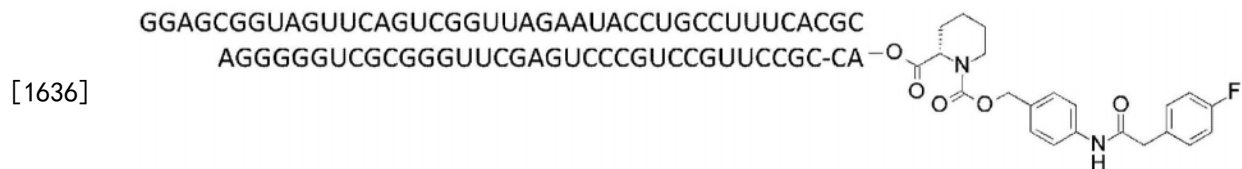
[1631] 化合物AAtR-72序列编号:272

[1632] nBuGly-tRNA (Asp1) _auc



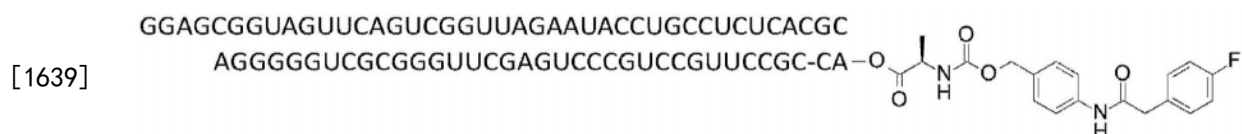
[1634] 化合物AAtR-73序列编号:273

[1635] Pic2-tRNA (Asp1) _uuc



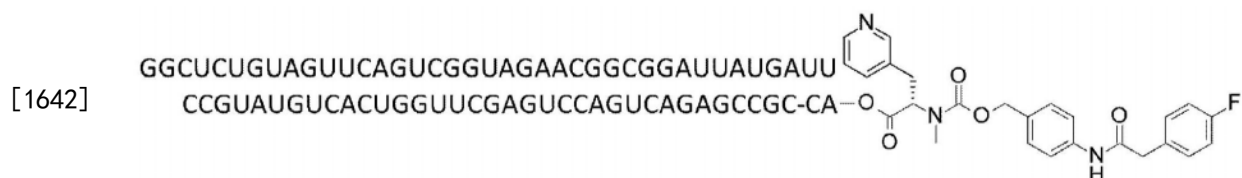
[1637] 化合物AAtR-74序列编号:274

[1638] nBuGly-tRNA (Asp1) _cuc



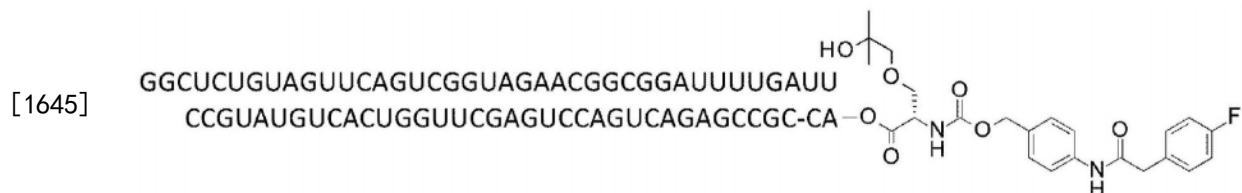
[1640] 化合物AAtR-75序列编号:275

[1641] MeA3Pr-tRNA (AsnE2+ACL) _aug



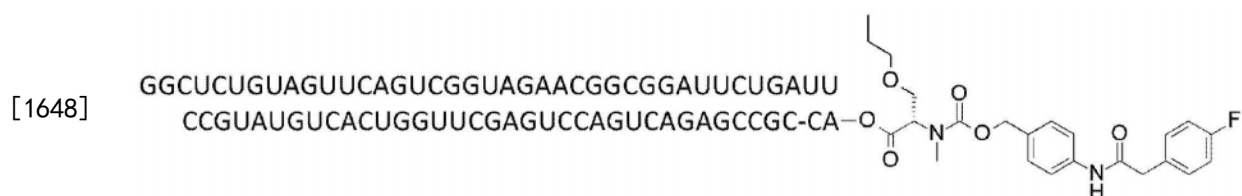
[1643] 化合物AAtR-76序列编号:276

[1644] StBuOH-tRNA (AsnE2+ACL) _uug



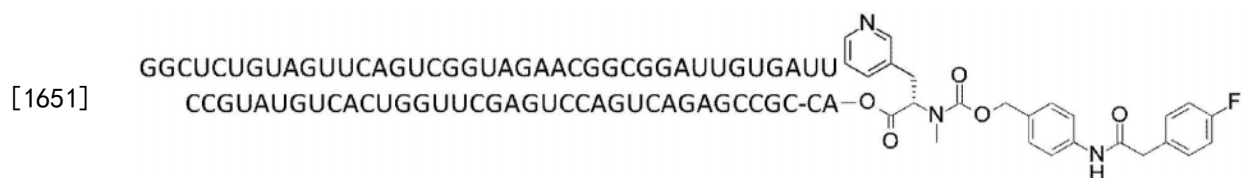
[1646] 化合物AAtR-77序列编号:277

[1647] MeSnPr-tRNA (AsnE2+ACL) _cug



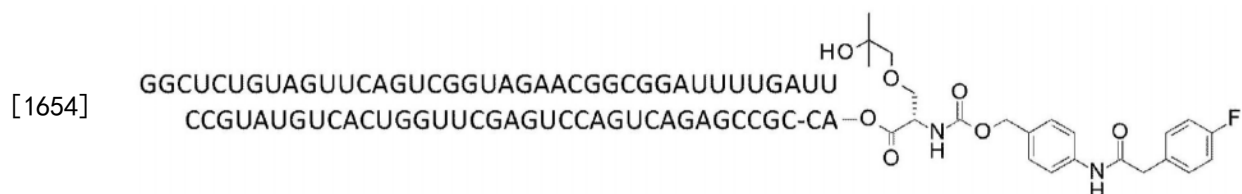
[1649] 化合物AAtR-78序列编号:278

[1650] MeA3Pr-tRNA (AsnE2+ACL) _gug



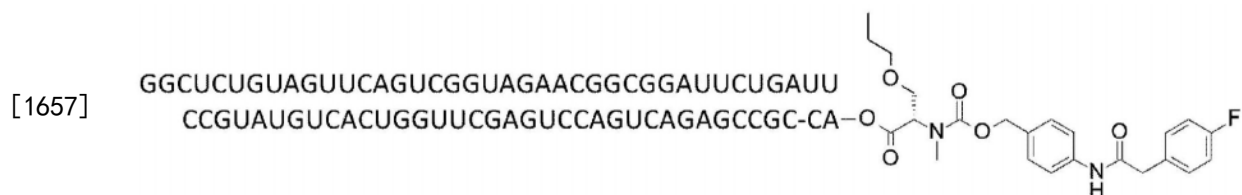
[1652] 化合物AA_tR-79序列编号:279

[1653] StBuOH-tRNA (AsnE2+ACL) _uug



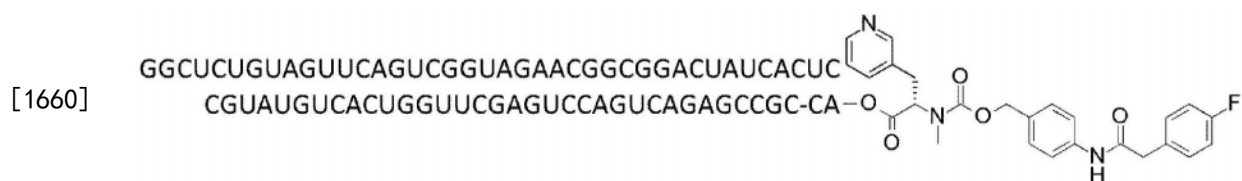
[1655] 化合物AA_tR-80序列编号:280

[1656] MeSnPr-tRNA (AsnE2+ACL) _cug



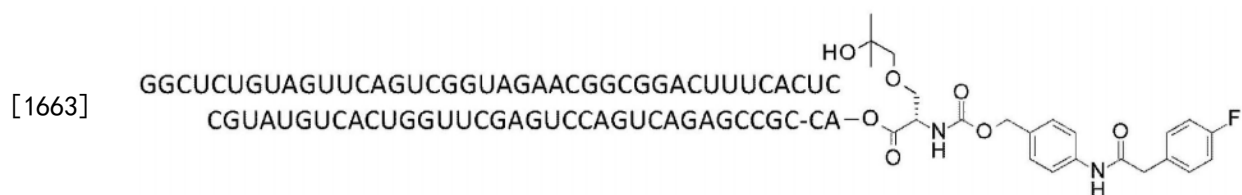
[1658] 化合物AA_tR-81序列编号:281

[1659] MeA3Pr-tRNA (AsnE2+ACL) _auc



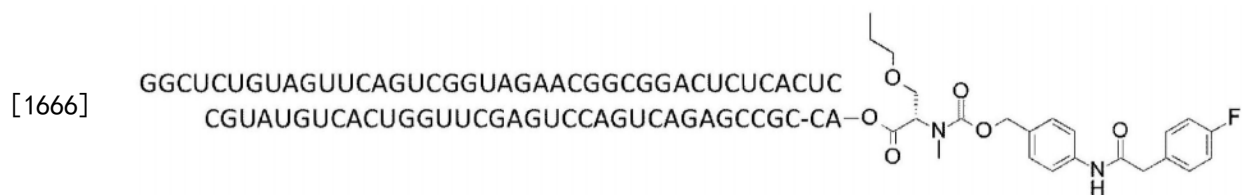
[1661] 化合物AA_tR-82序列编号:282

[1662] StBuOH-tRNA (AsnE2+ACL) _uuc



[1664] 化合物AA_tR-83序列编号:283

[1665] MeSnPr-tRNA (AsnE2+ACL) _cuc



[1667] 实施例6.肽的翻译合成

[1668] 随后,在3种氨酰化tRNA存在的状况下,实施用于确认1个密码子框中3种氨基酸的

区别读出的实验。具体地,应用氨酰化tRNA混合液翻译包含同一密码子框内的3种密码子中任一种、除此之外序列相同的模板mRNA(模板mRNA序列编号:134(mR-1)~序列编号:162(mR-29)、序列编号:219(mR-42)~序列编号:221(mR-44)),翻译合成肽化合物。在特定的密码子框中,可以区别读出彼此的摆动密码子,进一步还同时区别读出另一其它密码子。氨基酸以2种的组合验证,在任一种条件,在特定的密码子框中,都显示可区别读出1个密码子框内的3个氨基酸。

[1669] 翻译系统应用作为来自原核生物的重构无细胞蛋白合成系统的PURE系统。

[1670] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)来源的tRNA(Roche公司),0.26μM EF-G,0.24μM RF2,0.17μM RF3,0.5μM RRF,4μg/ml肌酸激酶,3μg/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1μg/ml二磷酸核苷激酶,2.7μM IF1,0.4μM IF2,1.5μM IF3,40μM EF-Tu,35μM EF-Ts,1μM EF-P-Lys,0.4单位/μl RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2μM核糖体,0.5mM PGA,0.09μM GlyRS,0.4μM IleRS,0.68μM PheRS,0.16μM ProRS,0.09μM ThrRS)中,使得1μM模板mRNA(序列编号:134(mR-1)、序列编号:135(mR-2)、或序列编号:136(mR-3))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AA-tR-25)为10μM、氨酰化tRNA混合液(化合物AA-tR-1、化合物AA-tR-2、化合物AA-tR-3的混合液)为30μM地向翻译反应混合物添加,在37℃静置1小时而进行。

[1671] 关于其它序列(序列编号:137(mR-4),序列编号:138(mR-5),序列编号:139(mR-6))也进行无细胞翻译。

[1672] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26μM EF-G,0.24μM RF2,0.17μM RF3,0.5μM RRF,4μg/ml肌酸激酶,3μg/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1μg/ml二磷酸核苷激酶,2.7μM IF1,0.4μM IF2,1.5μM IF3,40μM EF-Tu,35μM EF-Ts,1μM EF-P-Lys,0.4单位/μl RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2μM核糖体,0.5mM PGA,0.09μM GlyRS,0.4μM IleRS,0.68μM PheRS,0.16μM ProRS,0.09μM ThrRS)中,使得1μM模板mRNA(序列编号:137(mR-4)、序列编号:138(mR-5)、或序列编号:139(mR-6))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AA-tR-25)为10μM、氨酰化tRNA混合液(化合物AA-tR-4、化合物AA-tR-5、化合物AA-tR-6的混合液)为30μM地向翻译反应混合物添加,在37℃静置1小时而进行。

[1673] 关于其它序列(序列编号:140(mR-7),序列编号:141(mR-8),序列编号:142(mR-9))也进行无细胞翻译。

[1674] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26μM EF-G,0.24μM RF2,0.17μM RF3,0.5μM RRF,4μg/ml肌酸激酶,3μg/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1μg/ml二磷酸核苷激酶,2.7μM IF1,0.4μM IF2,1.5μM IF3,40μM EF-Tu,54μM EF-Ts,1μM EF-P-Lys,0.4单位/μl RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2μM核糖体,0.5mM PGA,0.09μM GlyRS,0.4μM IleRS,

0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) 中, 使得1 μ M模板mRNA (序列编号: 140 (mR-7)、序列编号: 141 (mR-8)、或序列编号: 142 (mR-9))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA (化合物AAtR-25) 为10 μ M、氨酰化tRNA混合液 (化合物AAtR-7、化合物AAtR-8、化合物AAtR-9的混合液、化合物AAtR-29、化合物AAtR-30、化合物AAtR-31的混合液、化合物AAtR-60、化合物AAtR-61、化合物AAtR-62的混合液、化合物AAtR-63、化合物AAtR-64、化合物AAtR-65的混合液或化合物AAtR-75、化合物AAtR-76、化合物AAtR-77的混合液) 为30 μ M地向翻译反应混合物添加, 在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1675] 关于其它序列 (序列编号: 143 (mR-10), 序列编号: 144 (mR-11), 序列编号: 145 (mR-12)) 也进行无细胞翻译。

[1676] 具体地, 在翻译液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mM磷酸肌酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM乙酸钾, 10mM乙酸镁, 2mM亚精胺, 1mM二硫苏糖醇, 1.5mg/ml大肠杆菌MRE600 (RNA酶阴性) 衍生的tRNA (Roche公司), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml肌酸激酶, 3 μ g/ml肌激酶, 2单位/ml无机焦磷酸酶, 1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 54 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂 (Promega公司, N2111), 1.2 μ M核糖体, 0.5mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) 中, 使得1 μ M模板mRNA (序列编号: 143 (mR-10)、序列编号: 144 (mR-11)、或序列编号: 145 (mR-12))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA (化合物AAtR-25) 为10 μ M、氨酰化tRNA混合液 (化合物AAtR-10、化合物AAtR-11、化合物AAtR-12的混合液、或化合物AAtR-32、化合物AAtR-33、化合物AAtR-34的混合液) 为30 μ M地向翻译反应混合物添加, 在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1677] 关于其它序列 (序列编号: 146 (mR-13), 序列编号: 147 (mR-14), 序列编号: 148 (mR-15)) 也进行无细胞翻译。

[1678] 具体地, 在翻译液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mM磷酸肌酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM乙酸钾, 10mM乙酸镁, 2mM亚精胺, 1mM二硫苏糖醇, 1.5mg/ml大肠杆菌MRE600 (RNA酶阴性) 衍生的tRNA (Roche公司), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml肌酸激酶, 3 μ g/ml肌激酶, 2单位/ml无机焦磷酸酶, 1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 49 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂 (Promega公司, N2111), 1.2 μ M核糖体, 0.5mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) 中, 使得1 μ M模板mRNA (序列编号: 146 (mR-13)、序列编号: 147 (mR-14)、或序列编号: 148 (mR-15))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA (化合物AAtR-25) 为10 μ M、氨酰化tRNA混合液 (化合物AAtR-13、化合物AAtR-14、化合物AAtR-15的混合液、化合物AAtR-72、化合物AAtR-73、化合物AAtR-74的混合液或化合物AAtR-81、化合物AAtR-82、化合物AAtR-83的混合液) 为30 μ M地向翻译反应混合物添加, 在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1679] 关于其它序列 (序列编号: 149 (mR-16), 序列编号: 150 (mR-17), 序列编号: 151 (mR-18)) 也进行无细胞翻译。

[1680] 具体地, 在翻译液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mM磷酸肌酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM乙酸钾, 10mM乙酸镁, 2mM亚精胺, 1mM二硫苏糖醇, 1.5mg/ml大肠杆菌MRE600 (RNA酶阴性) 衍生的tRNA (Roche公司), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml肌

酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,54 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ i RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M GlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS,0.02 μ M ValRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:149(mR-16),序列编号:150(mR-17),序列编号:151(mR-18))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA混合液(化合物AAtR-16、化合物AAtR-17、化合物AAtR-18的混合液、或化合物AAtR-38、化合物AAtR-39、化合物AAtR-40的混合液)为30 μ M地向翻译反应混合物添加,在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1681] 关于其它序列(序列编号:152(mR-19),序列编号:153(mR-20),序列编号:154(mR-21))也进行无细胞翻译。

[1682] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ M RRF,4 μ g/ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,35 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M GlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS,0.09 μ M ThrRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:152(mR-19)、序列编号:153(mR-20)、或序列编号:154(mR-21))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA混合液(化合物AAtR-19、化合物AAtR-20、化合物AAtR-21的混合液或化合物AAtR-41、化合物AAtR-42、化合物AAtR-43的混合液)为30 μ M地向翻译反应混合物添加,在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1683] 关于其它序列(序列编号:155(mR-22),序列编号:156(mR-23),序列编号:157(mR-24))也进行无细胞翻译。

[1684] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.25 μ M RF1,4 μ g /ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,34.6 μ M EF-Ts,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M GlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS,0.09 μ M ThrRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:155(mR-22)、序列编号:156(mR-23)、或序列编号:157(mR-24))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA混合液(化合物AAtR-22、化合物AAtR-23、化合物AAtR-24的混合液或化合物AAtR-44、化合物AAtR-45、化合物AAtR-46的混合液)为30 μ M地向翻译反应混合物添加,在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1685] 关于其它序列(序列编号:158(mR-25),序列编号:141(mR-8),序列编号:142(mR-9))也进行无细胞翻译。

[1686] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,3 μ M Ala1BtRNA1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ

M RRF, 4 μ g/ml 肌酸激酶, 3 μ g/ml 肌激酶, 2 单位/ml 无机焦磷酸酶, 1.1 μ g/ml 二磷酸核苷激酶, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 单位/ μ l RNasein 核糖核酸酶抑制剂 (Promega 公司, N2111), 1.2 μ M 核糖体, 0.5mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) 中, 使得 1 μ M 模板 mRNA (序列编号: 158 (mR-25)、序列编号: 141 (mR-8)、或序列编号: 142 (mR-9))、各自的模板 mRNA 编码的天然氨基酸组分别为各 0.25mM、起始氨酰化 tRNA (化合物 AAtR-25) 为 10 μ M、氨酰化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-26、化合物 AAtR-8、化合物 AAtR-9 的混合液、化合物 AAtR-47、化合物 AAtR-30、化合物 AAtR-31 的混合液、化合物 AAtR-66、化合物 AAtR-67、化合物 AAtR-68 的混合液、化合物 AAtR-69、化合物 AAtR-70、化合物 AAtR-71 的混合液或化合物 AAtR-78、化合物 AAtR-79、化合物 AAtR-80 的混合液) 为 30 μ M 地向翻译反应混合物添加, 在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 小时而进行。

[1687] 关于其它序列 (序列编号: 159 (mR-26), 序列编号: 144 (mR-11), 序列编号: 145 (mR-12)) 也进行无细胞翻译。

[1688] 具体地, 在翻译液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mM 磷酸肌酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM 乙酸钾, 10mM 乙酸镁, 2mM 亚精胺, 1mM 二硫苏糖醇, 3 μ M Ala1BtRNA 1.5mg/ml 大肠杆菌 MRE600 (RNA 酶阴性) 衍生的 tRNA (Roche 公司), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml 肌酸激酶, 3 μ g/ml 肌激酶, 2 单位/ml 无机焦磷酸酶, 1.1 μ g/ml 二磷酸核苷激酶, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 单位/ μ l RNasein 核糖核酸酶抑制剂 (Promega 公司, N2111), 1.2 μ M 核糖体, 0.5mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) 中, 使得 1 μ M 模板 mRNA (序列编号: 159 (mR-26)、序列编号: 144 (mR-11)、或序列编号: 145 (mR-12))、各自的模板 mRNA 编码的天然氨基酸组分别为各 0.25mM、起始氨酰化 tRNA (化合物 AAtR-25) 为 10 μ M、氨酰化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-27、化合物 AAtR-11、化合物 AAtR-12 的混合液、或化合物 AAtR-48、化合物 AAtR-33、化合物 AAtR-34 的混合液) 为 30 μ M 地向翻译反应混合物添加, 在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 小时而进行。

[1689] 关于其它序列 (序列编号: 162 (mR-29), 序列编号: 153 (mR-20), 序列编号: 154 (mR-21)) 也进行无细胞翻译。

[1690] 具体地, 在翻译液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mM 磷酸肌酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM 乙酸钾, 10mM 乙酸镁, 2mM 亚精胺, 1mM 二硫苏糖醇, 3 μ M Ala1BtRNA 1.5mg/ml 大肠杆菌 MRE600 (RNA 酶阴性) 衍生的 tRNA (Roche 公司), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml 肌酸激酶, 3 μ g/ml 肌激酶, 2 单位/ml 无机焦磷酸酶, 1.1 μ g/ml 二磷酸核苷激酶, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 单位/ μ l RNasein 核糖核酸酶抑制剂 (Promega 公司, N2111), 1.2 μ M 核糖体, 0.5mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) 中, 使得 1 μ M 模板 mRNA (序列编号: 162 (mR-29)、序列编号: 153 (mR-20)、或序列编号: 154 (mR-21))、各自的模板 mRNA 编码的天然氨基酸组分别为各 0.25mM、起始氨酰化 tRNA (化合物 AAtR-25) 为 10 μ M、氨酰化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-28、化合物 AAtR-20、化合物 AAtR-21 的混合液、或化合物 AAtR-51、化合物 AAtR-42、化合物 AAtR-43 的混合液) 为 30 μ M 地向翻译反应混合物添加, 在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 小时而进行。

[1691] 关于其它序列(序列编号:146(mR-13),序列编号:147(mR-14),序列编号:148(mR-15))也进行无细胞翻译。

[1692] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26μM EF-G,0.24μM RF2,0.17μM RF3,0.5μM RRF,4μg/ml肌酸激酶,3μg/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1μg/ml二磷酸核苷激酶,2.7μM IF1,0.4μM IF2,1.5μM IF3,40μM EF-Tu,54μM EF-Ts,1μM EF-P-Lys,0.4单位/μl RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2μM核糖体,0.5mM PGA,0.09μM GlyRS,0.4μM IleRS,0.68μM PheRS,0.16μM ProRS,0.09μM ThrRS)中,使得1μM模板mRNA(序列编号:146(mR-13)、序列编号:147(mR-14)、或序列编号:148(mR-15))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10μM、氨酰化tRNA混合液(化合物AAtR-35、化合物AAtR-36、化合物AAtR-37的混合液)为30μM地向翻译反应混合物添加,在37℃静置1小时而进行。

[1693] 关于其它序列(序列编号:152(mR-19),序列编号:153(mR-20),序列编号:154(mR-21))也进行无细胞翻译。

[1694] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26μM EF-G,0.24μM RF2,0.17μM RF3,0.5μM RRF,4μg/ml肌酸激酶,3μg/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1μg/ml二磷酸核苷激酶,2.7μM IF1,0.4μM IF2,1.5μM IF3,40μM EF-Tu,54μM EF-Ts,1μM EF-P-Lys,0.4单位/μl RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2μM核糖体,0.5mM PGA,0.09μM GlyRS,0.4μM IleRS,0.68μM PheRS,0.16μM ProRS,0.09μM ThrRS)中,使得1μM模板mRNA(序列编号:152(mR-19)、序列编号:153(mR-20)、或序列编号:154(mR-21))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10μM、氨酰化tRNA混合液(化合物AAtR-41、化合物AAtR-42、化合物AAtR-43的混合液)为30μM地向翻译反应混合物添加,在37℃静置1小时而进行。

[1695] 关于其它序列(序列编号:155(mR-22),序列编号:156(mR-23),序列编号:157(mR-24))也进行无细胞翻译。

[1696] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26μM EF-G,0.25μM RF1,4μg/ml肌酸激酶,3μg/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1μg/ml二磷酸核苷激酶,2.7μM IF1,0.4μM IF2,1.5μM IF3,40μM EF-Tu,34.6μM EF-Ts,0.4单位/μl RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2μM核糖体,0.5mM PGA,0.09μM GlyRS,0.4μM IleRS,0.68μM PheRS,0.16μM ProRS,0.09μM ThrRS)中,使得1μM模板mRNA(序列编号:155(mR-22)、序列编号:156(mR-23)、或序列编号:157(mR-24))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10μM、氨酰化tRNA混合液(化合物AAtR-44、化合物AAtR-45、化合物AAtR-46的混合液)为30μM地向翻译反应混合物添加,在37℃静置1小时而进行。

[1697] 关于其它序列(序列编号:160(mR-27),序列编号:147(mR-14),序列编号:148(mR-

15)) 也进行无细胞翻译。

[1698] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,3 μ M Ala1BtRNA1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ M RRF,4 μ g/ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,35 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M MGlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS,0.09 μ M ThrRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:160(mR-27)、序列编号:147(mR-14)、或序列编号:148(mR-15))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAatR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA混合液(化合物AAatR-49、化合物AAatR-36、化合物AAatR-37的混合液)为30 μ M地向翻译反应混合物添加,在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1699] 关于其它序列(序列编号:161(mR-28),序列编号:150(mR-17),序列编号:151(mR-18))也进行无细胞翻译。

[1700] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ M RRF,4 μ g/ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,35 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M GlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS,0.02 μ M ValRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:161(mR-28),序列编号:150(mR-17),序列编号:151(mR-18))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAatR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA混合液(化合物AAatR-50、化合物AAatR-39、化合物AAatR-40的混合液)为30 μ M地向翻译反应混合物添加,在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1701] 关于其它序列(序列编号:219(mR-42),序列编号:220(mR-43),序列编号:221(mR-44))也进行无细胞翻译。

[1702] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,3 μ M Ala1BtRNA1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ M RRF,4 μ g/ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,49 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M MGlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS,0.09 μ M ThrRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:219(mR-42)、序列编号:220(mR-43)、或序列编号:221(mR-44))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAatR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA混合液(化合物AAatR-57、化合物AAatR-59的混合液)为20 μ M、氨酰化tRNA(化合物AAatR-58)为20 μ M地向翻译反应混合物添加,在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1703] 随后,为了验证密码子框内的区别读出效率是否取决于氨酰化tRNA的浓度产生差

异,在翻译系统中仅存在具有XXA的反密码子的氨酰tRNA的状况下,以翻译量确认密码子框内的XXA密码子以外的密码子中交叉阅读的比例。具体地,向包含同一密码子框内的4种密码子中任一种、除此以外序列相同的模板mRNA(模板mRNA序列编号:163(mR-30)~序列编号:174(mR-41)),将具有XXA密码子的反密码子的氨酰化tRNA(化合物AAtR-52、或化合物AAtR-53、或化合物AAtR-54、或化合物AAtR-55、或化合物AAtR-56)以不同浓度条件加入,翻译合成肽化合物。

[1704] 显示密码子框内的区别读出比率取决于氨酰tRNA的浓度而变化。此外,也显示该现象不依赖于tRNA体序列、和带电氨基酸。

[1705] 翻译系统应用作为来自原核生物的重构无细胞蛋白合成系统的PURE系统。具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,3 μ M Ala1BtRNA1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ M RRF,4 μ g/ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,35 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M GlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS,0.09 μ M ThrRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:163(mR-30)、序列编号:164(mR-31)、序列编号:165(mR-32)、序列编号:166(mR-33))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA(化合物AAtR-52)为0.8 μ M或1.6 μ M或3.2 μ M、6.4 μ M或12.8 μ M地向翻译反应混合物添加,在37℃静置1小时而进行。

[1706] 关于其它密码子框也进行同样的验证。

[1707] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,3 μ M Ala1BtRNA1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ M RRF,4 μ g/ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,35 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ M GlyRS,0.4 μ M IleRS,0.68 μ M PheRS,0.16 μ M ProRS)中,使得1 μ M模板mRNA(序列编号:167(mR-34)、序列编号:168(mR-35)、序列编号:169(mR-36)、序列编号:170(mR-37))各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA(化合物AAtR-25)为10 μ M、氨酰化tRNA(化合物AAtR-53)为0.8 μ M或1.6 μ M或3.2 μ M、6.4 μ M或12.8 μ M地向翻译反应混合物添加,在37℃静置1小时而进行。

[1708] 关于其它密码子框也进行同样的验证。

[1709] 具体地,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,3 μ M Ala1BtRNA1.5mg/ml大肠杆菌MRE600(RNA酶阴性)衍生的tRNA(Roche公司),0.26 μ M EF-G,0.24 μ M RF2,0.17 μ M RF3,0.5 μ M RRF,4 μ g/ml肌酸激酶,3 μ g/ml肌激酶,2单位/ml无机焦磷酸酶,1.1 μ g/ml二磷酸核苷激酶,2.7 μ M IF1,0.4 μ M IF2,1.5 μ M IF3,40 μ M EF-Tu,35 μ M EF-Ts,1 μ M EF-P-Lys,0.4单位/ μ l RNasein核糖核酸酶抑制剂(Promega公司,N2111),1.2 μ M核糖体,0.5mM PGA,0.09 μ

MGlyRS, 0.68 μ M LeuRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS) 中, 使得1 μ M模板mRNA (序列编号: 171 (mR-38)、序列编号: 172 (mR-39)、序列编号: 173 (mR-40)、序列编号: 174 (mR-41))、各自的模板mRNA编码的天然氨基酸组分别为各0.25mM、起始氨酰化tRNA (化合物AA t R-25) 为10 μ M、氨酰化tRNA (化合物AA t R-54、或化合物AA t R-55、或化合物AA t R-56) 为0.8 μ M或1.6 μ M或3.2 μ M、6.4 μ M或12.8 μ M地向翻译反应混合物添加, 在37 $^{\circ}$ C静置1小时而进行。

[1710] 关于期望为模板mRNA的翻译肽化合物、其分子量, 在以下表4中记载。

[1711] [表4]

[1712]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	期望的翻译肽化合物	m/z [M-H]	R. T. (方法1)
化合物AA t R-1	mR-1	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.8	3.0
化合物AA t R-2	mR-2	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.8	3.0
化合物AA t R-3	mR-3	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.8	2.8
化合物AA t R-4	mR-4	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.8	3.0
化合物AA t R-5	mR-5	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.8	3.0
化合物AA t R-6	mR-6	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.8	2.8
化合物AA t R-7	mR-7	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1722.8	3.0
化合物AA t R-8	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.8	3.0
化合物AA t R-9	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.7	2.8
化合物AA t R-10	mR-10	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1722.8	3.0
化合物AA t R-11	mR-11	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.8	3.0
化合物AA t R-12	mR-12	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.8	2.8
化合物AA t R-13	mR-13	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1724.0	3.0
化合物AA t R-14	mR-14	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.0	3.0
化合物AA t R-15	mR-15	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.9	2.8
化合物AA t R-16	mR-16	BdpFL-Phe-TV11GV-nBuG-IIP1G	1626.8	2.8
化合物AA t R-17	mR-17	BdpFL-Phe-TV11GV-Pic2-IIP1G	1624.7	2.7
化合物AA t R-18	mR-18	BdpFL-Phe-TV11GV-dA-IIP1G	1584.7	2.6
化合物AA t R-19	mR-19	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1722.8	3.0
化合物AA t R-20	mR-20	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.8	3.0
化合物AA t R-21	mR-21	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.8	2.9
化合物AA t R-22	mR-22	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.7	3.0
化合物AA t R-23	mR-23	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.7	3.0
化合物AA t R-24	mR-24	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.7	2.8
化合物AA t R-26	mR-25	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1724.0	3.0
化合物AA t R-27	mR-26	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.0	3.0
化合物AA t R-28	mR-29	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.0	3.0
化合物AA t R-29	mR-7	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.7	2.6
化合物AA t R-30	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1768.7	2.9
化合物AA t R-31	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.7	3.1
化合物AA t R-32	mR-10	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1771.7	2.6
化合物AA t R-33	mR-11	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.7	2.9
化合物AA t R-34	mR-12	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1752.7	3.1
化合物AA t R-35	mR-13	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.7	2.6
化合物AA t R-36	mR-14	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.7	2.9
化合物AA t R-37	mR-15	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1752.7	3.1
化合物AA t R-38	mR-16	BdpFL-Phe-TV11GV-MeA3Pr-IIP1G	1675.7	2.4
化合物AA t R-39	mR-17	BdpFL-Phe-TV11GV-StBuOH-IIP1G	1673.8	2.7
化合物AA t R-40	mR-18	BdpFL-Phe-TV11GV-MeSnPr-IIP1G	1656.8	2.9
化合物AA t R-41	mR-19	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1771.7	2.6
化合物AA t R-42	mR-20	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1768.7	2.9
化合物AA t R-43	mR-21	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1752.7	3.1
化合物AA t R-44	mR-22	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6

[1713]

化合物 A A t R-45	mR-23	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1770.0	2.9
化合物 A A t R-46	mR-24	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1754.0	3.1
化合物 A A t R-47	mR-25	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.1	2.6
化合物 A A t R-48	mR-26	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6
化合物 A A t R-49	mR-27	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6
化合物 A A t R-50	mR-28	BdpFL-Phe-TV11GV-MeA3Pr-IIP1G	1676.0	2.4
化合物 A A t R-51	mR-29	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6
化合物 A A t R-52	mR-32	BdpFL-Phe-TF11GF-MeHph-IIP1G	1786.0	3.1
化合物 A A t R-53	mR-36	BdpFL-Phe-PF11GF-MeHph-IIP1G	1782.0	3.2
化合物 A A t R-54	mR-40	BdpFL-Phe-TFLLGF-MeHph-LLPLG	17860.0	3.3
化合物 A A t R-55	mR-40	BdpFL-Phe-TFLLGF-MeHph-LLPLG	1786.0	3.3
化合物 A A t R-56	mR-40	BdpFL-Phe-TFLLGF-Ile-LLPLG	1724.0	3.4
化合物 A A t R-57	mR-42	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1724.0	3.1
化合物 A A t R-58	mR-43	BdpFL-Phe-TF11GF-SPh2Cl-IIP1G	1807.9	3.2
化合物 A A t R-59	mR-44	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.9	2.9
化合物 A A t R-60	mR-7	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.96	3.0
化合物 A A t R-61	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.95	3.0
化合物 A A t R-62	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.91	2.9
化合物 A A t R-63	mR-7	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-64	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.94	3.0
化合物 A A t R-65	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.91	2.8
化合物 A A t R-66	mR-25	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-67	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.94	3.0
化合物 A A t R-68	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.91	2.8
化合物 A A t R-69	mR-25	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-70	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.94	3.0
化合物 A A t R-71	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.91	2.8
化合物 A A t R-72	mR-13	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-73	mR-14	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-74	mR-15	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.9	2.8
化合物 A A t R-75	mR-7	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.96	2.6
化合物 A A t R-76	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.97	2.9
化合物 A A t R-77	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.98	3.1
化合物 A A t R-78	mR-25	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.96	2.6
化合物 A A t R-79	mR-8	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.96	2.9
化合物 A A t R-80	mR-9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.97	3.1
化合物 A A t R-81	mR-13	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.95	2.6
化合物 A A t R-82	mR-14	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.97	2.9
化合物 A A t R-83	mR-15	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.97	3.1

[1714] 从模板DNA(序列编号:175(D-35)~序列编号:215(D-75)和序列编号:216(D-79)~序列编号:218(D-81)),通过应用RiboMAX Large Scale RNA production System T7(Promega公司,P1300)的体外转录反应,合成模板mRNA(序列编号:134(mR-1)~序列编号:174(mR-41)、序列编号:219(mR-42)~序列编号:221(mR-44)),通过RNeasy Mini kit(Qiagen公司)纯化。

[1715] 模板DNA序列编号:175(D-35)

[1716] DNA序列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

[1717]

TCTTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[1718] 模板DNA序列编号:176(D-36)

- [1719] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1720] TCTAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1721] 模板DNA序列编号:177 (D-37)
- [1722] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1723] TCTGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1724] 模板DNA序列编号:178 (D-38)
- [1725] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1726] TGTTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1727] 模板DNA序列编号:179 (D-39)
- [1728] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1729] TGTAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1730] 模板DNA序列编号:180 (D-40)
- [1731] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1732] TGTGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1733] 模板DNA序列编号:181 (D-41)
- [1734] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1735] TCATATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1736] 模板DNA序列编号:182 (D-42)
- [1737] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1738] TCAAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1739] 模板DNA序列编号:183 (D-43)
- [1740] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
- [1741] TCAGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1742] 模板DNA序列编号:184 (D-44)
- [1743] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
- [1744] TAATATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG
- [1745]

- [1746] 模板DNA序列编号:185 (D-45)
[1747] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
[1748] TAAAATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG
[1749] 模板DNA序列编号:186 (D-46)
[1750] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
[1751] TAAGATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG
[1752] 模板DNA序列编号:187 (D-47)
[1753] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
[1754] TCATATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1755] 模板DNA序列编号:188 (D-48)
[1756] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
[1757] TCAAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1758] TCAAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1759] 模板DNA序列编号:189 (D-49)
[1760] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
[1761] TCAGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1762] 模板DNA序列编号:190 (D-50)
[1763] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT
[1764] TTTTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1765] 模板DNA序列编号:191 (D-51)
[1766] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT
[1767] TTTAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1768] 模板DNA序列编号:192 (D-52)
[1769] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT
[1770] TTTGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1771] 模板DNA序列编号:193 (D-53)
[1772] DNA序列:

- [1773] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TAGTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1774] 模板DNA序列编号:194 (D-54)
- [1775] DNA序列:
- [1776] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TAGAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1777] 模板DNA序列编号:195 (D-55)
- [1778] DNA序列:
- [1779] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TAGGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1780] 模板DNA序列编号:196 (D-56)
- [1782] DNA序列:
- [1783] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
TTGCATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG
- [1784] 模板DNA序列编号:197 (D-57)
- [1785] DNA序列:
- [1786] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
TTGAATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG
- [1787] 模板DNA序列编号:198 (D-58)
- [1788] DNA序列:
- [1789] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
TTGGATTATTCCGATTCTATAAGCTTC
- [1790] 模板DNA序列编号:199 (D-59)
- [1791] DNA序列:
- [1792] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TCACATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1793] 模板DNA序列编号:200 (D-60)
- [1794] DNA序列:
- [1795] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TAACATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
- [1796] 模板DNA序列编号:201 (D-61)
- [1797] DNA序列:
- [1798] GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
TGACATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG
- [1799] 模板DNA序列编号:202 (D-62)

- [1800] DNA序列:
[1801] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT
[1802] TTTCATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1803] 模板DNA序列编号:203 (D-63)
[1804] DNA序列:
[1805] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
TAGCATTATTCCGATTCTATAAGCTTC
[1806] 模板DNA序列编号:204 (D-64)
[1807] DNA序列:
[1808] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TTCTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1809] 模板DNA序列编号:205 (D-65)
[1810] DNA序列:
[1811] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TTCCATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1812] 模板DNA序列编号:206 (D-66)
[1813] DNA序列:
[1814] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TTCAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1815] 模板DNA序列编号:207 (D-67)
[1816] DNA序列:
[1817] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TTCGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1818] 模板DNA序列编号:208 (D-68)
[1819] DNA序列:
[1820] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT
TACTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1821] 模板DNA序列编号:209 (D-69)
[1822] DNA序列:
[1823] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT
TACCATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1824] 模板DNA序列编号:210 (D-70)
[1825] DNA序列:
[1826] GGC GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT
TACAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1827]

- [1828] 模板DNA序列编号:211 (D-71)
[1829] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT
[1830] TACGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1831] 模板DNA序列编号:212 (D-72)
[1832] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT
[1833] TATTCTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG
[1834] 模板DNA序列编号:213 (D-73)
[1835] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT
[1836] TATCCTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG
[1837] 模板DNA序列编号:214 (D-74)
[1838] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT
[1839] TATACTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG
[1840] 模板DNA序列编号:215 (D-75)
[1841] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT
[1842] TATGCTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG
[1843] 模板DNA序列编号:216 (D-79)
[1844] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
[1845] TCGTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1846] 模板DNA序列编号:217 (D-80)
[1847] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
[1848] TCGAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1849] 模板DNA序列编号:218 (D-81)
[1850] DNA序列:
GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
[1851] TCGGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG
[1852] 模板mRNA序列编号:134 (m R-1)
[1853] RNA序列:
[1854]

- [1855] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCUUAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1856] 模板mRNA序列编号:135 (m R-2)
- [1857] RNA序列:
- [1858] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCUAAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1859] 模板mRNA序列编号:136 (m R-3)
- [1860] RNA序列:
- [1861] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCUGAUUAUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1862] 模板mRNA序列编号:137 (m R-4)
- [1863] RNA序列:
- [1864] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUGUUAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1865] 模板mRNA序列编号:138 (m R-5)
- [1866] RNA序列:
- [1867] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUGUAAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1868] AGCUUCG
- [1869] 模板mRNA序列编号:139 (m R-6)
- [1870] RNA序列:
- [1871] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUGUGAUUAUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1872] 模板mRNA序列编号:140 (m R-7)
- [1873] RNA序列:
- [1874] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCAUAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1875] 模板mRNA序列编号:141 (m R-8)
- [1876] RNA序列:
- [1877] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCAAAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1878] 模板mRNA序列编号:142 (m R-9)
- [1879] RNA序列:
- [1880] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCAGAUUAUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1881] 模板mRNA序列编号:143 (m R-10)

- [1882] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUCUAUUUAAUUAUUCGGAUUCUAUA
- [1883] AGCUUCG
- [1884] 模板mRNA序列编号:144 (m R-11)
- [1885] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUCUAUUUAAAAUUAUUCGGAUUCUAUA
- [1886] AGCUUCG
- [1887] 模板mRNA序列编号:145 (m R-12)
- [1888] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUCUAUUUAAGAUUAUUCGGAUUCUAUA
- [1889] AGCUUCG
- [1890] 模板mRNA序列编号:146 (m R-13)
- [1891] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUGAUUAUUAUUCGGAUUGGUUA
- [1892] AGCUUCG
- [1893] 模板mRNA序列编号:147 (m R-14)
- [1894] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUGAAAUUAUUCGGAUUGGUUA
- [1895] AGCUUCG
- [1896] 模板mRNA序列编号:148 (mR-15)
- [1897] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUGAGAUUAUUCGGAUUGGUUA
- [1898] AGCUUCG
- [1899] 模板mRNA序列编号:149 (mR-16)
- [1900] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUGUUUAUUAUUGGUGUUUUUUAUUAUUCGGAUUGGUUA
- [1901] AGCUUCG
- [1902] 模板mRNA序列编号:150 (mR-17)
- [1903] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUGUUUAUUAUUGGUGUUUUAAUUAUUCGGAUUGGUUA
- [1904] AGCUUCG
- [1905] 模板mRNA序列编号:151 (mR-18)
- [1906] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUGUUUAUUAUUGGUGUUUUUGAUUAUUCGGAUUGGUUA
- [1907] AGCUUCG
- [1908]

- [1909] 模板mRNA序列编号:152 (mR-19)
[1910] RNA序列:
[1911] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUAGUAUUUCCGAUUGGUUA
[1912] AGCUUCG
[1913] 模板mRNA序列编号:153 (m R-20)
[1914] RNA序列:
[1915] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUAGAAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
[1916] 模板mRNA序列编号:154 (m R-21)
[1917] RNA序列:
[1918] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUAGGAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
[1919] 模板mRNA序列编号:155 (mR-22)
[1920] RNA序列:
[1921] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUCUAAUUUUGCAUUUCCGAUUCUAUA
AGCUUCG
[1922] 模板mRNA序列编号:156 (m R-23)
[1923] RNA序列:
[1924] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUCUAAUUUUGAAUUUCCGAUUCUAUA
AGCUUCG
[1925] 模板mRNA序列编号:157 (mR-24)
[1926] RNA序列:
[1927] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUCUAAUUUUGGAUUUCCGAUUCUAUA
AGCUUCG
[1928] 模板mRNA序列编号:₁₅₈ (mR-₂₅)
[1929] RNA序列:
[1930] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUCACAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
[1931] 模板mRNA序列编号:159 (mR-26)
[1932] RNA序列:
[1933] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUAACAUUUCCGAUUGGUUA
[1934] AGCUUCG
[1935] 模板mRNA序列编号:160 (mR-27)
[1936] RNA序列:

- [1937] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUGACAUUAUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1938] 模板mRNA序列编号:161 (mR-28)
- [1939] RNA序列:
- [1940] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUGUUAUUUUGGUGUUUUCAUUAUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1941] 模板mRNA序列编号:162 (mR-29)
- [1942] RNA序列:
- [1943] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUCUUAUUUAGCAUUAUCCGAUUCUAUA
AGCUUCG
- [1944] 模板mRNA序列编号:163 (mR-30)
- [1945] RNA序列:
- [1946] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUUCUUAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1947] 模板mRNA序列编号:164 (mR-31)
- [1948] RNA序列:
- [1949] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUUCUUAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1950] 模板mRNA序列编号:165 (mR-32)
- [1951] RNA序列:
- [1952] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUUCUUAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1953] 模板mRNA序列编号:166 (mR-33)
- [1954] RNA序列:
- [1955] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUUCGAUUAUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1956] 模板mRNA序列编号:167 (mR-34)
- [1957] RNA序列:
- [1958] GGGUUAACUUUAUAAGGAGAUUAAUAUGCCGUUUUAUUUUGGUUUUACUUAUUUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1959] 模板mRNA序列编号:168 (mR-35)
- [1960] RNA序列:
- [1961] GGGUUAACUUUAUAAGGAGAUUAAUAUGCCGUUUUAUUUUGGUUUUACCAUUAUCCGAUUGGUUA
AGCUUCG
- [1962] 模板mRNA序列编号:169 (mR-36)

- [1964] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGCCGUUUAUUUUGGUUUUACAAUUAUCCGAUUGGUUA
- [1965] AGCUUCG
- [1966] 模板mRNA序列编号:170 (mR-37)
- [1967] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGCCGUUUAUUUUGGUUUUACGAUUAUCCGAUUGGUUA
- [1968] AGCUUCG
- [1969] 模板mRNA序列编号:171 (mR-38)
- [1970] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUUCUACUACCGCUAGGUUA
- [1971] AGCUUCG
- [1972] 模板mRNA序列编号:172 (m R-39)
- [1973] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUCCUACUACCGCUAGGUUA
- [1974] AGCUUCG
- [1975] 模板mRNA序列编号:173 (m R-40)
- [1976] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUACUACUACCGCUAGGUUA
- [1977] AGCUUCG
- [1978] 模板mRNA序列编号:174 (m R-41)
- [1980] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUGCUACUACCGCUAGGUUA
- [1981] AGCUUCG
- [1982] 模板mRNA序列编号:219 (mR-42)
- [1983] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUCGUUUUAUCCGAUUGGUUA
- [1984] AGCUUCG
- [1985] 模板mRNA序列编号:220 (mR-43)
- [1986] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUCGAAUUAUCCGAUUGGUUA
- [1987] AGCUUCG
- [1988] 模板mRNA序列编号:221 (m R-44)
- [1989] RNA序列:
GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUCGGAUUAUCCGAUUGGUUA
- [1990] AGCUUCG

[1991] 实施例7. 翻译肽的分析

[1992] 将实施例6中配制的非天然肽翻译溶液稀释10倍,应用LC-FLR-MS的装置分析。对于分析数据,通过从MS数据鉴定成为对象的翻译肽的保留时间、定量该保留时间的荧光峰,评价肽翻译量。另外,对于定量评价,以实施例4中合成的LCT12、或实施例3中合成的LCT067为标准品制成标准曲线,通过相对定量算出含量。对于LC-MS,按照下述表5的条件,相应于成为对象的样品选择最适条件并分析。

[1993] [表5]

分析条件	装置	柱	流动相	梯度(%B)	流速(mL/min)	柱温度	荧光测定波长(Ex/Em)	MS模式
[1994] 方法1	Aquity UPLC-FLR -Xevo G2-XS Tof	waters BEH C18(2.1 x 50mm, ϕ 1.7 μ m)	A=0.1%FA 具有 H ₂ O B=0.1%FA 具有 CH ₃ CN	0-0.2min=10% 0.2-3.6min=98% 3.6-4.0 min=10%	0.5	40	491 nm/ 515 nm	ESI-

[1995] 评价的结果示于表6~表33、图1~图28。在测试的密码子框中,在CUX和GUX中,通过交叉阅读翻译了稍微多的目的之外的氨基酸,未观察到充分的区别读出效果(表6~表7、图1~图2)。另一方面,在它们以外的密码子框中,任一种都观察到与3种密码子对应的特异性氨基酸的翻译,确认充分的区别读出效果。另外确认,即使变更tRNA体(反密码子以外的序列部分),也得到同样的效果。(表8~表28-9、图3~图23-9)。此外,增加翻译系统中添加的tRNA的浓度时,目的肽和交叉阅读的翻译量共同增加,但提示其增加的比例可相互不同(表29~表33、图24~图28)。由此认为,还可设定tRNA浓度的最适条件(与交叉阅读相比目的肽可更有效翻译的条件)。

[1996] [表6]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μ M)
[1997] 化合物AA t R-1 化合物AA t R-2 化合物AA t R-3	mR-1	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP G	1.22
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP G	0.41
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP G	0.00
	mR-2	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP G	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP G	1.44
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP G	0.02
	mR-3	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP G	0.04
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP G	0.40
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP G	1.44

[1998] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CUU, CUA, CUG)。

[1999] [表7]

[2000]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-4 化合物AA t R-5 化合物AA t R-6	mR-4	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.76
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.26
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
		mR-5	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.19
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
		mR-6	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.32
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.73

[2001] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:GUU, GUA, GUG)。

[2002] [表8]

[2003]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-7 化合物AA t R-8 化合物AA t R-9	mR-7	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	1.11
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.03
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
		mR-8	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.04
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.45
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.03
		mR-9	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.01
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.13
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.28

[2004] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAU, CAA, CAG)。

[2005] [表9]

[2006]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-10 化合物AA t R-11 化合物AA t R-12	mR-10	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.84
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.04
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.04
		mR-11	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.04
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.15
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.02
		mR-12	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.01
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.05
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.41

[2007] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AAU, AAA, AAG)。

[2008] [表10]

[2009]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-13 化合物AA t R-14 化合物AA t R-15	mR-13	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	1.19
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
		mR-14	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	2.38
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.02
		mR-15	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.01
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.12
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.36

[2010] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:GAU, GAA, GAG)。

[2011] [表11]

[2012]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-16 化合物AA t R-17 化合物AA t R-18	mR-16	BdpFL-Phe-TV IG V-nBuG -IP IG	0.49
			BdpFL-Phe-TV IG V-P ic2-IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TV IG V-dA -IP IG	0.00
		mR-17	BdpFL-Phe-TV IG V-nBuG -IP IG	0.04
			BdpFL-Phe-TV IG V-P ic2-IP IG	1.53
			BdpFL-Phe-TV IG V-dA -IP IG	0.00
		mR-18	BdpFL-Phe-TV IG V-nBuG -IP IG	0.02
			BdpFL-Phe-TV IG V-P ic2-IP IG	0.11
			BdpFL-Phe-TV IG V-dA -IP IG	1.17

[2013] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:UUU, UUA, UUG)。

[2014] [表12]

[2015]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-19 化合物AA t R-20 化合物AA t R-21	mR-19	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.85
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
		mR-20	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.62
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.02
		mR-21	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.02
			BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.35

[2016] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AGU, AGA, AGG)。

[2017] [表13]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2018] 化合物AA t R-22 化合物AA t R-23 化合物AA t R-24	mR-22	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	1.18
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.03
	mR-23	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.03
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.27
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
	mR-24	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.01
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.05
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.53

[2019] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:UGC, UGA, UGG)。

[2020] [表14]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2021] 化合物AA t R-26 化合物AA t R-8 化合物AA t R-9	mR-25	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.19
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
	mR-8	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.39
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
	mR-9	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.03
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.27

[2022] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAC, CAA, CAG)。

[2023] [表15]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2024] 化合物AA t R-27 化合物AA t R-11 化合物AA t R-12	mR-26	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.16
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
	mR-11	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.26
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
	mR-12	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.21

[2025] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AAC, AAA, AAG)。

[2026] [表16]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2027] 化合物AA t R-28 化合物AA t R-20 化合物AA t R-21	mR-29	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG-IP IG	0.20
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA-IP IG	0.00
	mR-20	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.36
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA-IP IG	0.00
	mR-21	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA-IP IG	0.11

[2028] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AGC, AGA, AGG)。

[2029] [表17]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2030] 化合物AA t R-29 化合物AA t R-30 化合物AA t R-31	mR-7	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	1.29
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP IG	0.05
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-8	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP IG	1.31
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.03
	mR-9	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP IG	0.10
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	1.80

[2031] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAU, CAA, CAG)。

[2032] [表18]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2033] 化合物AA t R-32 化合物AA t R-33 化合物AA t R-34	mR-10	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.74
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP IG	0.04
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-11	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP IG	0.77
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-12	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP IG	0.06
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	1.64

[2034] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AAU, AAA, AAG)。

[2035] [表19]

[2036]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-35 化合物AA t R-36 化合物AA t R-37	mR-13	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP G	0.91
			BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP G	0.03
			BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP G	0.01
		mR-14	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP G	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP G	1.50
			BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP G	0.07
		mR-15	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP G	0.01
			BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP G	0.13
			BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP G	1.87

[2037] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:GAU, GAA, GAG)。

[2038] [表20]

[2039]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-38 化合物AA t R-39 化合物AA t R-40	mR-16	BdpFL-Phe-TV IG V-M eA3Pr-IP G	0.50
			BdpFL-Phe-TV IG V-S tBuO H-IP G	0.00
			BdpFL-Phe-TV IG V-M eSnPr-IP G	0.01
		mR-17	BdpFL-Phe-TV IG V-M eA3Pr-IP G	0.02
			BdpFL-Phe-TV IG V-S tBuO H-IP G	0.96
			BdpFL-Phe-TV IG V-M eSnPr-IP G	0.03
		mR-18	BdpFL-Phe-TV IG V-M eA3Pr-IP G	0.02
			BdpFL-Phe-TV IG V-S tBuO H-IP G	0.14
			BdpFL-Phe-TV IG V-M eSnPr-IP G	1.77

[2040] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:UUU, UUA, UUG)。

[2041] [表21]

[2042]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-41 化合物AA t R-42 化合物AA t R-43	mR-19	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP G	0.95
			BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP G	0.02
			BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP G	0.01
		mR-20	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP G	0.00
			BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP G	1.16
			BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP G	0.02
		mR-21	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP G	0.01
			BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H-IP G	0.08
			BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP G	1.50

[2043] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AGU, AGA, AGG)。

[2044] [表22]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2045] 化合物A A t R-44 化合物A A t R-45 化合物A A t R-46	mR-22	BdpFL-Phe-TFIF-MeA3Pr-IPIG	1.39
		BdpFL-Phe-TFIF-StBuOH-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIF-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-23	BdpFL-Phe-TFIF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIF-StBuOH-IPIG	0.99
		BdpFL-Phe-TFIF-MeSnPr-IPIG	0.01
	mR-24	BdpFL-Phe-TFIF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIF-StBuOH-IPIG	0.07
		BdpFL-Phe-TFIF-MeSnPr-IPIG	1.82

[2046] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:UGC, UGA, UGG)。

[2047] [表23]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2048] 化合物A A t R-47 化合物A A t R-30 化合物A A t R-31	mR-25	BdpFL-Phe-TFIFG-MeA3Pr-IPIG	0.58
		BdpFL-Phe-TFIFG-StBuOH-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIFG-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-8	BdpFL-Phe-TFIFG-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIFG-StBuOH-IPIG	0.39
		BdpFL-Phe-TFIFG-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-9	BdpFL-Phe-TFIFG-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIFG-StBuOH-IPIG	0.05
		BdpFL-Phe-TFIFG-MeSnPr-IPIG	0.59

[2049] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAC, CAA, CAG)。

[2050] [表24]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2051] 化合物A A t R-48 化合物A A t R-33 化合物A A t R-34	mR-26	BdpFL-Phe-TFIFG-MeA3Pr-IPIG	0.55
		BdpFL-Phe-TFIFG-StBuOH-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIFG-MeSnPr-IPIG	0.01
	mR-11	BdpFL-Phe-TFIFG-MeA3Pr-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIFG-StBuOH-IPIG	0.22
		BdpFL-Phe-TFIFG-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-12	BdpFL-Phe-TFIFG-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIFG-StBuOH-IPIG	0.04
		BdpFL-Phe-TFIFG-MeSnPr-IPIG	0.50

[2052] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AAC, AAA, AAG)。

[2053] [表25]

[2054]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物A A t R-49 化合物A A t R-36 化合物A A t R-37	mR-27	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.47
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IIPIG	0.01
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.01
		mR-14	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.01
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IIPIG	0.40
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.01
		mR-15	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IIPIG	0.05
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.35

[2055] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:GAC, GAA, GAG)。

[2056] [表26]

[2057]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物A A t R-50 化合物A A t R-39 化合物A A t R-40	mR-28	BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeA3Pr-IIPIG	0.65
			BdpFL-Phe-TVIIIGV-StBuOH-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeSnPr-IIPIG	0.00
		mR-17	BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeA3Pr-IIPIG	0.03
			BdpFL-Phe-TVIIIGV-StBuOH-IIPIG	0.33
			BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeSnPr-IIPIG	0.00
		mR-18	BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeA3Pr-IIPIG	0.01
			BdpFL-Phe-TVIIIGV-StBuOH-IIPIG	0.04
			BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeSnPr-IIPIG	0.58

[2058] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:UUC, UUA, UUG)。

[2059] [表27]

[2060]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物A A t R-51 化合物A A t R-42 化合物A A t R-43	mR-29	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.55
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.00
		mR-20	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.01
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IIPIG	0.36
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.02
		mR-21	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IIPIG	0.05
			BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.35

[2061] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:AGC, AGA, AGG)。

[2062] [表28]

[2063]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-57 化合物AA t R-58 化合物AA t R-59	mR-42	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.49
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Ph2C-IIPIG	0.02
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.01
		mR-43	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.09
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Ph2C-IIPIG	1.62
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.01
		mR-44	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.02
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Ph2C-IIPIG	0.15
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	1.68

[2064] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CGU, CGA, CGG)。

[2065] [表28-2]

[2066]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-60 化合物AA t R-61 化合物AA t R-62	mR-7	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.55
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
		mR-8	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.27
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
		mR-9	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.03
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.35

[2067] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAU, CAA, CAG)。

[2068] [表28-3]

[2069]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-63 化合物AA t R-64 化合物AA t R-65	mR-7	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.58
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
		mR-8	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.31
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
		mR-9	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.41

[2070] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAU, CAA, CAG)。

[2071] [表28-4]

[2072]	氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
	化合物AA t R-66 化合物AA t R-67 化合物AA t R-68	mR-25	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.60
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
		mR-8	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.29
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
		mR-9	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
			BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.36

[2073] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAC, CAA, CAG)。

[2074] [表28-5]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2075] 化合物 A A t R-69 化合物 A A t R-70 化合物 A A t R-71	m R - 2 5	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.62
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	m R - 8	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.30
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	m R - 9	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.42

[2076] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAC, CAA, CAG)。

[2077] [表28-6]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2078] 化合物 A A t R-72 化合物 A A t R-73 化合物 A A t R-74	m R - 1 3	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.76
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	m R - 1 4	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.33
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	m R - 1 5	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.37

[2079] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:GAU, GAA, GAG)。

[2080] [表28-7]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2081] 化合物 A A t R-75 化合物 A A t R-76 化合物 A A t R-77	m R - 7	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.31
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.00
	m R - 8	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IIPIG	0.86
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.02
	m R - 9	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IIPIG	0.55

[2082] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子:CAU, CAA, CAG)。

[2083] [表28-8]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2084] 化合物AA t R-78 化合物AA t R-79 化合物AA t R-80	m R - 2 5	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-11PIG	0.31
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-11PIG	0.00
	m R - 8	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-11PIG	0.01
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-11PIG	0.80
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-11PIG	0.00
	m R - 9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-11PIG	0.01
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-11PIG	0.02
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-11PIG	0.46

[2085] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子: CAC, CAA, CAG)。

[2086] [表28-9]

氨酰化tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2087] 化合物AA t R-81 化合物AA t R-82 化合物AA t R-83	m R - 1 3	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-11PIG	0.32
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-11PIG	0.00
	m R - 1 4	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-11PIG	0.05
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-11PIG	0.75
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-11PIG	0.02
	m R - 1 5	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-11PIG	0.01
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-11PIG	0.52

[2088] 1个密码子框中3个氨基酸区别读出的翻译评价结果的表(评价的密码子: GAU, GAA, GAG)。

[2089] [表29-1]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
[2090] 化合物AA t R-52	12.8 μM	m R - 3 0	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-11PIG	1.26
		m R - 3 1		0.18
		m R - 3 2		1.22
		m R - 3 3		0.62
	6.4 μM	m R - 3 0		0.82
		m R - 3 1		0.09
		m R - 3 2		1.24
		m R - 3 3		0.36
	3.2 μM	m R - 3 0		0.80
		m R - 3 1		0.05
		m R - 3 2		0.86
		m R - 3 3		0.22
	1.6 μM	m R - 3 0		0.50
		m R - 3 1		0.03
		m R - 3 2		0.45
		m R - 3 3		0.11
	0.8 μM	m R - 3 0		0.30
		m R - 3 1		0.02
		m R - 3 2		0.31
		m R - 3 3		0.08

[2091] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化的结果的表(评价的密码子: UCU, UCC, UCA, UCG)。

[2092] [表29-2]

[2093]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	相对于XXA翻译量的比率(%)
化合物AA t R-52	12.8 μ M	mR-30	BdpFL-Phe-TF IG F-M eH ph-IP IG	103.71
		mR-31		15.04
		mR-32		100.00
		mR-33		51.25
	6.4 μ M	mR-30		65.60
		mR-31		7.24
		mR-32		100.00
		mR-33		28.77
	3.2 μ M	mR-30		93.81
		mR-31		5.72
		mR-32		100.00
		mR-33		26.15
	1.6 μ M	mR-30		109.74
		mR-31		6.94
		mR-32		100.00
		mR-33		25.36
	0.8 μ M	mR-30		95.28
		mR-31		5.34
		mR-32		100.00
		mR-33		24.15

[2094] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化,算出与目的产物量的比率的结果的表(评价的密码子:UCU,UCC,UCA,UCG)。

[2095] [表30-1]

[2096]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μ M)
化合物AA t R-53	12.8 μ M	mR-34	BdpFL-Phe-PF IG F-M eH ph-IP IG	0.79
		mR-35		0.50
		mR-36		0.98
		mR-37		0.61
	6.4 μ M	mR-34		0.88
		mR-35		0.30
		mR-36		0.85
		mR-37		0.54
	3.2 μ M	mR-34		0.64
		mR-35		0.25
		mR-36		1.09
		mR-37		0.44
	1.6 μ M	mR-34		0.55
		mR-35		0.14
		mR-36		0.64
		mR-37		0.29
	0.8 μ M	mR-34		0.26
		mR-35		0.07
		mR-36		0.32
		mR-37		0.15

[2097] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化的结果的表(评价的密码子:ACU,ACC,ACA,ACG)。

[2098] [表30-2]

[2099]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	相对于XXA翻译量的比率(%)
化合物AA t R-53	12.8 μ M	mR-34	BdpFL-Phe-PFIDF-M eHph-IPD	81.10
		mR-35		50.86
		mR-36		100.00
		mR-37		62.59
	6.4 μ M	mR-34		102.50
		mR-35		35.06
		mR-36		100.00
		mR-37		63.60
	3.2 μ M	mR-34		58.61
		mR-35		23.37
		mR-36		100.00
		mR-37		40.64
	1.6 μ M	mR-34		86.06
		mR-35		21.38
		mR-36		100.00
		mR-37		45.21
	0.8 μ M	mR-34		80.76
		mR-35		20.68
		mR-36		100.00
		mR-37		46.62

[2100] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化,算出与目的产物量的比率的结果的表(评价的密码子:ACU,ACC,ACA,ACG)。

[2101] [表31-1]

[2102]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μ M)
化合物AA t R-54	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLGF-M eHph-LLPLG	0.30
		mR-39		0.01
		mR-40		0.70
		mR-41		0.56
	6.4 μ M	mR-38		0.20
		mR-39		0.00
		mR-40		0.47
		mR-41		0.31
	3.2 μ M	mR-38		0.11
		mR-39		0.00
		mR-40		0.30
		mR-41		0.17
	1.6 μ M	mR-38		0.06
		mR-39		0.00
		mR-40		0.16
		mR-41		0.09
	0.8 μ M	mR-38		0.03
		mR-39		0.00
		mR-40		0.09
		mR-41		0.05

[2103] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化的结果的表(评价的密码子:AUU,AUC,AUA,AUG)。

[2104] [表31-2]

[2105]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	相对于XXA翻译量的比率(%)
化合物AA t R-54	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLGF-M eH ph-LLPLG	42.15
		mR-39		1.31
		mR-40		100.00
		mR-41		79.24
	6.4 μ M	mR-38		42.10
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		65.60
	3.2 μ M	mR-38		35.22
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		57.26
	1.6 μ M	mR-38		37.49
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		53.26
	0.8 μ M	mR-38		33.80
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		55.92

[2106] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化,算出与目的产物量的比率的结果的表(评价的密码子:AUU,AUC,AUA,AUG)。

[2107] [表32-1]

[2108]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μ M)
化合物AA t R-55	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLGF-M eH ph-LLPLG	0.21
		mR-39		0.00
		mR-40		0.77
		mR-41		0.43
	6.4 μ M	mR-38		0.13
		mR-39		0.00
		mR-40		0.53
		mR-41		0.24
	3.2 μ M	mR-38		0.08
		mR-39		0.00
		mR-40		0.36
		mR-41		0.12
	1.6 μ M	mR-38		0.04
		mR-39		0.00
		mR-40		0.19
		mR-41		0.04
	0.8 μ M	mR-38		0.02
		mR-39		0.00
		mR-40		0.11
		mR-41		0.03

[2109] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化的结果的表(评价的密码子:AUU,AUC,AUA,AUG)。

[2110] [表32-2]

[2111]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	相对于XXA翻译量的比率(%)
化合物AA t R-55	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLGF-N eHph-LLPLG	27.95
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		56.55
	6.4 μ M	mR-38		24.78
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		44.82
	3.2 μ M	mR-38		22.45
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		34.96
	1.6 μ M	mR-38		21.43
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		21.04
	0.8 μ M	mR-38		16.07
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		25.31

[2112] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化,算出与目的产物量的比率的结果的表(评价的密码子:AUU,AUC,AUA,AUG)。

[2113] [表33-1]

[2114]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μ M)
化合物AA t R-56	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLGF-Ile-LLPLG	0.91
		mR-39		0.55
		mR-40		1.11
		mR-41		1.25
	6.4 μ M	mR-38		0.82
		mR-39		0.47
		mR-40		0.95
		mR-41		1.09
	3.2 μ M	mR-38		0.69
		mR-39		0.34
		mR-40		0.76
		mR-41		0.62
	1.6 μ M	mR-38		0.39
		mR-39		0.25
		mR-40		0.53
		mR-41		0.31
	0.8 μ M	mR-38		0.23
		mR-39		0.13
		mR-40		0.25
		mR-41		0.14

[2115] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化的结果的表(评价的密码子:AUU,AUC,AUA,AUG)。

[2116] [表33-2]

[2117]

氨酰化tRNA	氨酰化tRNA浓度	模板mRNA序列	翻译肽化合物	相对于XXA翻译量的比率(%)
化合物AA t R-56	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLG F-Ile-LLPLG	82.07
		mR-39		49.45
		mR-40		100.00
		mR-41		112.80
	6.4 μ M	mR-38		86.46
		mR-39		49.15
		mR-40		100.00
		mR-41		115.09
	3.2 μ M	mR-38		90.81
		mR-39		44.24
		mR-40		100.00
		mR-41		82.09
	1.6 μ M	mR-38		73.46
		mR-39		47.96
		mR-40		100.00
		mR-41		58.19
	0.8 μ M	mR-38		89.86
		mR-39		50.80
		mR-40		100.00
		mR-41		54.77

[2118] 用翻译实验验证对单一密码子氨酰化tRNA浓度依赖性的、目的产物和相同密码子框内的交叉阅读翻译物的翻译量的变化,算出与目的产物量的比率的结果的表(评价的密码子:AUU,AUC,AUA,AUG)。

[2119] 对于前述发明,以帮助明确理解为目的应用实例和示例详细记载,但本说明书中的记载和示例不应解释为限定本发明的范围。本说明书中引用的所有专利文献和科学文献的公开内容全部通过参考明确并入本说明书。

[2120] 产业上的可利用性

[2121] 在一个方式中,本公开的tRNA在能够区别读出天然遗传密码表中未被区别读出的NNA的密码子和NNG的密码子、NNU的密码子和NNA的密码子和NNG的密码子、以及NNC的密码子和NNA的密码子和NNG的密码子的方面是有用的。在一个方式中,本公开的翻译系统在能够翻译比应用天然遗传密码表的翻译系统多的种类的氨基酸(密码子扩展)的方面是有用的。

序列表

<110> 中外制药株式会社

<120> 具有改变的遗传密码表的翻译系统

<130> C1-A2018P

<150> JP 2020-109576

<151> 2020-06-25

<160> 283

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-1

<400> 1

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaagac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 2

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-2

<400> 2

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttagac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 3

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-3

<400> 3

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcagac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 4

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-4

<400> 4

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaacac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 5

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-5

<400> 5

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttacac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 6

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-6

<400> 6

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcacac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 7

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-7

<400> 7

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctatgac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 8

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-8

<400> 8
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctttgac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 9
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-9
<400> 9
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctctgac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 10
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-10
<400> 10
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctattac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 11
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-11
<400> 11
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttttac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 12
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-12
<400> 12
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcttac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 13
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-13
<400> 13
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctatcac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 14
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-14
<400> 14
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctttcac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 15
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-15
<400> 15
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctctcac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 16
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-16
<400> 16
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaaaac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 17
<211> 95
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-17

<400> 17

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttaaac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 18

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-18

<400> 18

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcaaac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 19

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-19

<400> 19

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctactac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 20

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-20

<400> 20

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttctac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 21

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-21

<400> 21
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcctac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 22
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-22
<400> 22
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgcaac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 23
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-23
<400> 23
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttcaac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 24
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-24
<400> 24
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctccaac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 25
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-25
<400> 25
ggcgtaatac gactcactat aggcgggggtg gacgagcctg gtagctcgtc gggctcataa 60
cccgaagatc gtcggttcaa atccggcccc cgcaa 95

<210> 26
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-26
<400> 26
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgtgac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 27
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-27
<400> 27
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgttac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 28
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-28
<400> 28
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgtcac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 29
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-29
<400> 29
ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgaaac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 30
<211> 95
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-30

<400> 30

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgctac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 31

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-31

<400> 31

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttgaac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 32

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-32

<400> 32

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttgtac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 33

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-33

<400> 33

ggcgtaatac gactcactat agtcccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttatac 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 34

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-34

<400> 34
ggcgtaatac gactcactat aggcccctta gctcagtggt tagagcaggc gacttataat 60
cgcttggtcg ctgggtcaag tccagcaggg gccac 95

<210> 35
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-76

<400> 35
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgacgac 60
ggcggttaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 36
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-77

<400> 36
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttcgac 60
ggcggttaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 37
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-78

<400> 37
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctccgac 60
ggcggttaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 38
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-1

<400> 38
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuaagacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 39

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-2

<400> 39

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuuagacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuaggagg acgc 74

<210> 40

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-3

<400> 40

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucagacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuaggagg acgc 74

<210> 41

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-4

<400> 41

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuaacacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuaggagg acgc 74

<210> 42

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-5

<400> 42

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuacacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuaggagg acgc 74

<210> 43

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-6

<400> 43

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucacacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 44

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-7

<400> 44

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuugacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 45

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-8

<400> 45

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuugacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 46

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-9

<400> 46

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucugacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 47

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-10

<400> 47

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 48

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-11

<400> 48

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuuuuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 49

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-12

<400> 49

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucuuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 50

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-13

<400> 50

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 51

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-14

<400> 51

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuucacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 52
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-15
<400> 52
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccucucacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 53
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-16
<400> 53
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaaaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 54
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-17
<400> 54
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccuuaaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 55
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-18
<400> 55
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccucaaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 56
<211> 74
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-19

<400> 56

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuacuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 57

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-20

<400> 57

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 58

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-21

<400> 58

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuccuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 59

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-22

<400> 59

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugcaacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 60

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-23

<400> 60

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuccaacg gcgguaacag gggucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 61

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-24

<400> 61

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuccaacg gcgguaacag gggucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 62

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-25

<400> 62

ggcggggugg agcagccugg uagcucgucg ggcucuaaac ccgaagaucg ucgguucaaa 60
uccggcccc gcaa 74

<210> 63

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-26

<400> 63

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuugugacg gcgguaacag gggucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 64

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-27

<400> 64

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuguuacg gcgguaacag gggucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 65

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-28

<400> 65

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugucacg gcgguaacag gguucgau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 66

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-29

<400> 66

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugaaacg gcgguaacag gguucgau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 67

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-30

<400> 67

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugcuacg gcgguaacag gguucgau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 68

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-31

<400> 68

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuugaacg gcgguaacag gguucgau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 69

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-32

<400> 69

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuguacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 70

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-33

<400> 70

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 71

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-34

<400> 71

ggccccuag cucagugguu agagcaggcg acuuauaau gcuuggucg ugguucaagu 60
ccagcagggg ccac 74

<210> 72

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-35

<400> 72

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugcgacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 73

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-36

<400> 73

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucgacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 74

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-37

<400> 74

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucgacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgc 74

<210> 75

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-1

<400> 75

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuaagacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 76

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-2

<400> 76

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuagacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 77

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-3

<400> 77

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucagacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 78

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-4

<400> 78

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuaacacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 79

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-5

<400> 79

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuacacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 80

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-6

<400> 80

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucacacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 81

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-7

<400> 81

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuaugacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 82

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-8

<400> 82

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuugacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 83

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-9

<400> 83

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucugacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 84

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-10

<400> 84

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 85

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-11

<400> 85

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuuuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 86

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-12

<400> 86

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccucuuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuaggagg acgcca 76

<210> 87

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-13

<400> 87

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauacacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuaggagg acgcca 76

<210> 88

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-14

<400> 88

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccuuucacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuaggagg acgcca 76

<210> 89

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-15

<400> 89

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccucucacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuaggagg acgcca 76

<210> 90

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-16

<400> 90

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaaaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuaggagg acgcca 76

<210> 91
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-17
<400> 91
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaaacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76
<210> 92
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-18
<400> 92
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucaaacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76
<210> 93
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-19
<400> 93
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuacuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76
<210> 94
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-20
<400> 94
gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76
<210> 95
<211> 76
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-21

<400> 95

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucucuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 96

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-22

<400> 96

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugcaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 97

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-23

<400> 97

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 98

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-24

<400> 98

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuccaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 99

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-25

<400> 99
ggcggggugg agcagccugg uagcucgucg ggcucuaaac ccgaagaucg ucgguucaaa 60
uccggccccc gcaaca 76

<210> 100
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-26

<400> 100
guccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccugugacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 101
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-27

<400> 101
guccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuguuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 102
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-28

<400> 102
guccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccugcuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 103
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> AAtR-29

<400> 103
guccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauagacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 104

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-30

<400> 104

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuugacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 105

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-31

<400> 105

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucugacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 106

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-32

<400> 106

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 107

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-33

<400> 107

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuuuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 108

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-34

<400> 108

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucuuacg gcgguaacag gguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 109

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-35

<400> 109

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuauacg gcgguaacag gguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 110

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-36

<400> 110

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuucacg gcgguaacag gguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 111

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-37

<400> 111

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucucacg gcgguaacag gguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 112

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-38

<400> 112

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaaaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 113

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-39

<400> 113

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaaaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 114

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-40

<400> 114

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucaaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 115

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-41

<400> 115

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuacuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 116

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-42

<400> 116

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 117

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-43

<400> 117

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucuccuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuuagggg acgcca 76

<210> 118

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-44

<400> 118

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucugcaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuuagggg acgcca 76

<210> 119

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-45

<400> 119

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucucaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuuagggg acgcca 76

<210> 120

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-46

<400> 120

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccucuccaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuuagggg acgcca 76

<210> 121

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-47

<400> 121

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugugacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 122

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-48

<400> 122

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuguuacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 123

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-49

<400> 123

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugucacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 124

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-50

<400> 124

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugaaacg gcgguaacag gguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 125

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-51

<400> 125

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccugcuacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 126

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-52

<400> 126

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccuugaacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 127

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-53

<400> 127

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccuuguacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 128

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-54

<400> 128

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg cccuuauacg gcgguaacag ggguucgaau 60
cccuagggg acgcca 76

<210> 129

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-55

<400> 129

ggccccuag cucagugguu agagcaggcg acuuauaau gcuuggucgc ugguucaagu 60
ccagcagggg ccacca 76

<210> 130

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-56

<400> 130

ggcccccuuag cucagugguu agagcaggcg acuuauaauc gcuuggucgc ugguucaagu 60
ccagcagggg ccacca 76

<210> 131

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-57

<400> 131

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccugcgacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 132

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-58

<400> 132

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucgacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 133

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-59

<400> 133

gucccccucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucgacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 134

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-1

<400> 134

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc uuauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 135

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-2

<400> 135

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc uaauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 136

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-3

<400> 136

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc ugauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 137

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-4

<400> 137

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuug uuauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 138

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-5

<400> 138

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuug uaauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 139

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-6

<400> 139

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuug ugauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 140

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-7

<400> 140

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc auauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 141

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-8

<400> 141

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc aaauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 142

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-9

<400> 142

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc agauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 143

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-10

<400> 143

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuua auauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 144

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-11

<400> 144

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuua aaauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 145

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-12

<400> 145

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuua agauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 146

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-13

<400> 146

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuug auauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 147

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-14

<400> 147

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuug aaauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 148

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-15

<400> 148

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuug agauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 149

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-16

<400> 149

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuguuuuu auugguguuu uuauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 150

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-17

<400> 150

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuguuuuu auugguguuu uaauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 151

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-18

<400> 151

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuguuuuu auugguguuu ugauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 152

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-19

<400> 152

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu guauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 153

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-20

<400> 153

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu gaauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 154

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-21

<400> 154

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu ggauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 155

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-22

<400> 155

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu gcuuuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 156
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> mR-23
<400> 156
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu gaauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76
<210> 157
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> mR-24
<400> 157
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu ggauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76
<210> 158
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> mR-25
<400> 158
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc acauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76
<210> 159
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> mR-26
<400> 159
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuua acauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76
<210> 160
<211> 76
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-27

<400> 160

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuug acauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 161

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-28

<400> 161

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuguuuuu auugguguuu ucauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 162

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-29

<400> 162

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu gcauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 163

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-30

<400> 163

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu cuuuuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 164

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-31

<400> 164

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu ccuuuuuucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 165

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-32

<400> 165

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu cauuuuuucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 166

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-33

<400> 166

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuu cgauuuuucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 167

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-34

<400> 167

ggguuaacuu uaauaaggag auauaaaauau gccguuuuuu auugguuuuu cuuuuuuucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 168

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-35

<400> 168

ggguuaacuu uaauaaggag auauaaaauau gccguuuuuu auugguuuuu ccuuuuuucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

<210> 169

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-36

<400> 169

ggguuaacuu uaauaaggag auauaaaauau gccguuuauu auugguuuua cauuauucc 60
gauugguuua gcuucg 76

<210> 170

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-37

<400> 170

ggguuaacuu uaauaaggag auauaaaauau gccguuuauu auugguuuua cgauuauucc 60
gauugguuua gcuucg 76

<210> 171

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-38

<400> 171

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuucua cuagguuuua uucuacuacc 60
gcuagguuua gcuucg 76

<210> 172

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-39

<400> 172

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuucua cuagguuuua uccuacuacc 60
gcuagguuua gcuucg 76

<210> 173

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-40

<400> 173

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuucua cuagguuuua uacuacuacc 60
gcuagguuuaa gcuucg 76

<210> 174

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-41

<400> 174

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuucua cuagguuuua ugcuaacuacc 60
gcuagguuuaa gcuucg 76

<210> 175

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-35

<400> 175

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt cttattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 176

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-36

<400> 176

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt ctaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 177

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-37

<400> 177

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt ctgattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 178

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-38

<400> 178

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt gttattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 179

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-39

<400> 179

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt gtaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 180

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-40

<400> 180

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt gtgattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 181

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-41

<400> 181

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt catattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 182

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-42

<400> 182

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt caaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 183

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-43

<400> 183

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt cagattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 184

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-44

<400> 184

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt aatattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 185

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-45

<400> 185

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt aaaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 186

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-46

<400> 186

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt aagattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 187

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-47

<400> 187

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt gatattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 188

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-48

<400> 188

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt gaaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 189

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-49

<400> 189

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt gagattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 190

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-50

<400> 190

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgactgttat 60
tattgggtgtt tttattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 191

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-51

<400> 191

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgactgttat 60
tattgggtgtt ttaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 192

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-52

<400> 192

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgactgttat 60
tattgggtgtt ttgattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 193

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-53

<400> 193

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt agtattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 194

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-54

<400> 194

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt agaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 195

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-55

<400> 195

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt aggattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 196

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-56

<400> 196

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt tgcattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 197

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-57

<400> 197

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt tgaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 198

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-58

<400> 198

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggttttt tggattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 199

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-59

<400> 199

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt cacattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 200

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-60

<400> 200

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt aacattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 201

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-61

<400> 201

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt gacattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 202

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-62

<400> 202

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgactgttat 60
tattgggtgtt ttcattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 203

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-63

<400> 203

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt agcattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 204

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-64

<400> 204

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt tctattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 205

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-65

<400> 205

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt tccattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 206

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-66

<400> 206

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt tcaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 207

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-67

<400> 207

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt tcgattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 208

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-68

<400> 208

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaataagga gatataaata tgccgtttat 60
tattgggtttt actattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 209

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-69

<400> 209

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaataagga gatataaata tgccgtttat 60
tattgggtttt accattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 210

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-70

<400> 210

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaataagga gatataaata tgccgtttat 60
tattgggtttt acaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 211

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-71

<400> 211

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaataagga gatataaata tgccgtttat 60
tattgggtttt acgattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 212

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-72

<400> 212

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttct 60
actaggtttt attctactac cgctaggtta agcttcg 97

<210> 213

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-73

<400> 213

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttct 60
actaggtttt atcctactac cgctaggtta agcttcg 97

<210> 214

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-74

<400> 214

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttct 60
actaggtttt atactactac cgctaggtta agcttcg 97

<210> 215

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-75

<400> 215

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttct 60
actaggtttt atgctactac cgctaggtta agcttcg 97

<210> 216

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-79

<400> 216

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt cgtattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 217

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-80

<400> 217

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt cgaattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 218

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-81

<400> 218

ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattgggtttt cggattattc cgattgggta agcttcg 97

<210> 219

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-42

<400> 219

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc guauuuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 220

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> mR-43

<400> 220

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc gaauuuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76

<210> 221
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> mR-44
<400> 221
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuuuu auugguuuuc ggauuauucc 60
gauugguuuaa gcuucg 76
<210> 222
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> LCT12
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa = BdpFL
<400> 222
Xaa Phe Thr Ile Phe Pro Gly Phe Ile Ile Thr Thr Gly Thr Gly Thr
1 5 10 15
Gly Ala
<210> 223
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> LCT67
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa = BdpFL
<400> 223
Xaa Phe Thr Phe Ile Ile Gly Phe Ile Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 224
<211> 96
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-82

<400> 224

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctaugac 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96

<210> 225

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-83

<400> 225

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttaugat 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96

<210> 226

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-84

<400> 226

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctgugac 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96

<210> 227

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-85

<400> 227

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttgugat 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96

<210> 228

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-86

<400> 228

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctuugac 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgctccg ttccgc 96

<210> 229

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-87

<400> 229

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttuugat 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgctccg ttccgc 96

<210> 230

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-88

<400> 230

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctcugac 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgctccg ttccgc 96

<210> 231

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-89

<400> 231

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttcugat 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgctccg ttccgc 96

<210> 232

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-90

<400> 232

ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctaucac 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgctccg ttccgc 96

<210> 233
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-91
<400> 233
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctuucac 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgccg ttccgc 96
<210> 234
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-92
<400> 234
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctcucac 60
gcaggggggtc gcgggttcga gtcccgccg ttccgc 96
<210> 235
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-93
<400> 235
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattatgatt 60
ccgtatgtca ctgggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 236
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> D-94
<400> 236
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattgtgatt 60
ccgtatgtca ctgggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 237
<211> 95
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-95

<400> 237

ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattttgatt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95

<210> 238

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-96

<400> 238

ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattctgatt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95

<210> 239

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-97

<400> 239

ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactatcact 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95

<210> 240

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-98

<400> 240

ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactttcact 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95

<210> 241

<211> 95

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> D-99

<400> 241

ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactctcact 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95

<210> 242

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-38

<400> 242

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuugacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 243

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-39

<400> 243

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuuugaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 244

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-40

<400> 244

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccugugacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 245

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-41

<400> 245

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuugugaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 246
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-42
<400> 246
ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuuugacg caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 247
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-43
<400> 247
ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuuuugaug caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 248
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-44
<400> 248
ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccucugacg caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 249
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> TR-45
<400> 249
ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuucugaug caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 250
<211> 75
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-46

<400> 250

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuauacag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 251

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-47

<400> 251

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuuucacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 252

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-48

<400> 252

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccucucacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 253

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-49

<400> 253

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuauauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 254

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-50

<400> 254

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auugugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 255

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-51

<400> 255

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuuugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 256

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-52

<400> 256

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 257

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-53

<400> 257

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acuaucacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 258

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-54

<400> 258

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acuuucacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 259

<211> 74

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> TR-55

<400> 259

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acucucacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 260

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-60

<400> 260

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuagacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 261

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-61

<400> 261

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuugacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 262

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-62

<400> 262

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccucugacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 263

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-63

<400> 263

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuuaugaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 264

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-64

<400> 264

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuuuugaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 265

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-65

<400> 265

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuucugaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 266

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-66

<400> 266

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccugugacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 267

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-67

<400> 267

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuuugacg caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 268

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-68

<400> 268

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccucugacg caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 269

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-69

<400> 269

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuugugaug caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 270

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-70

<400> 270

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuuuugaug caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 271

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-71

<400> 271

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gcuucugaug caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 272

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-72

<400> 272

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuauacag caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 273

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-73

<400> 273

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccuuucacg caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 274

<211> 77

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-74

<400> 274

ggagcggguag uucagucggu uagaauaccu gccucucacg caggggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

<210> 275

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-75

<400> 275

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuaugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 276

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-76

<400> 276

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuuugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 277

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-77

<400> 277

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 278

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-78

<400> 278

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auugugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 279

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-79

<400> 279

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuuugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 280

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-80

<400> 280

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucugauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 281

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-81

<400> 281

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acuaucacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 282

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-82

<400> 282

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acuucacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

<210> 283

<211> 76

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> AAtR-83

<400> 283

ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acucucacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76

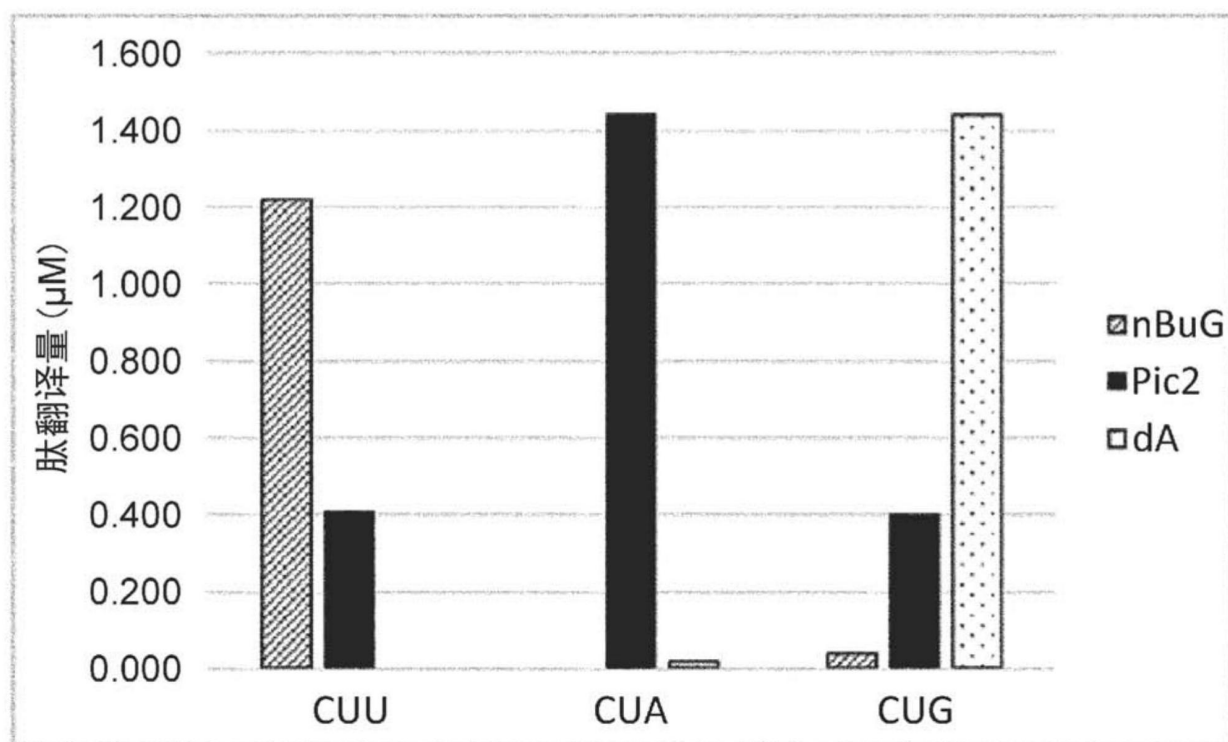


图1

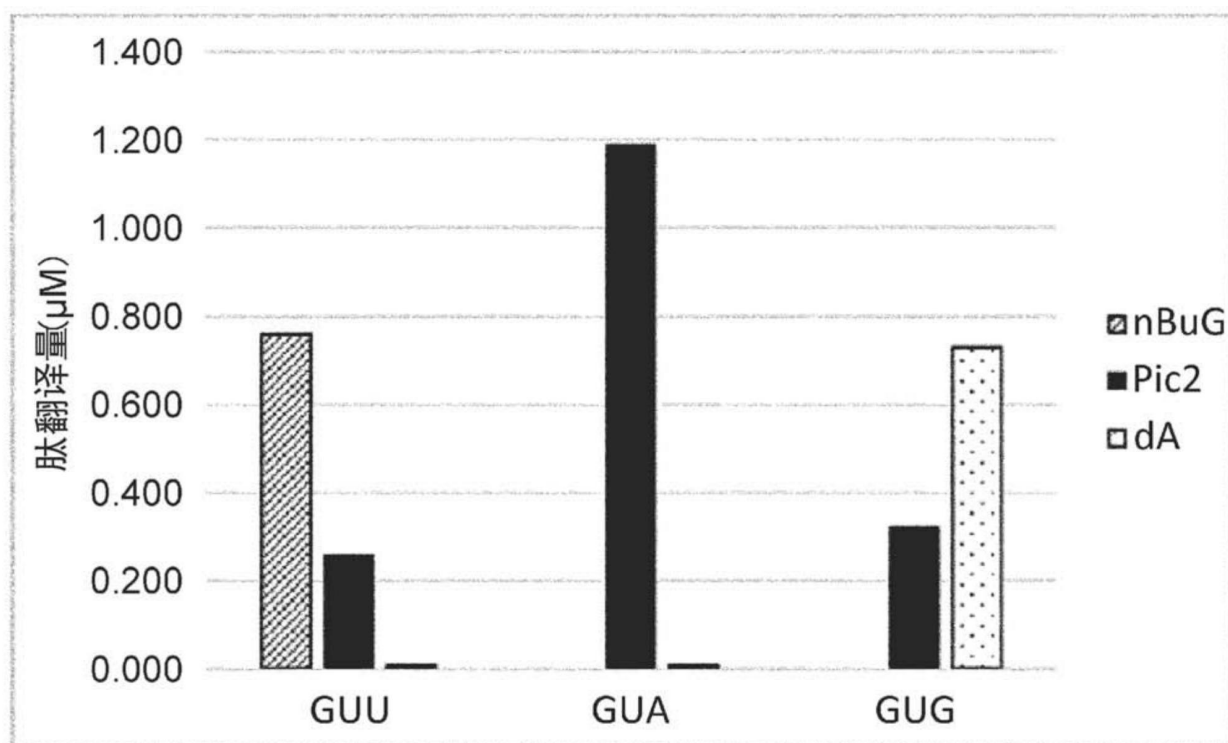


图2

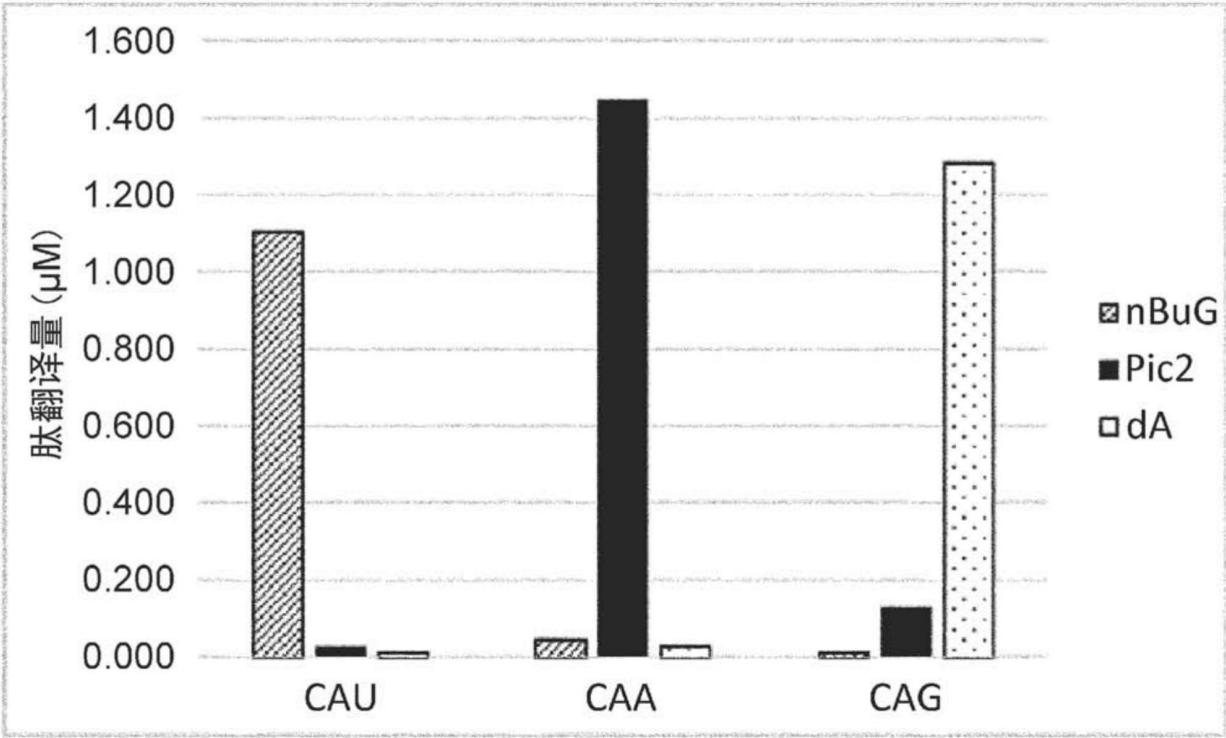


图3

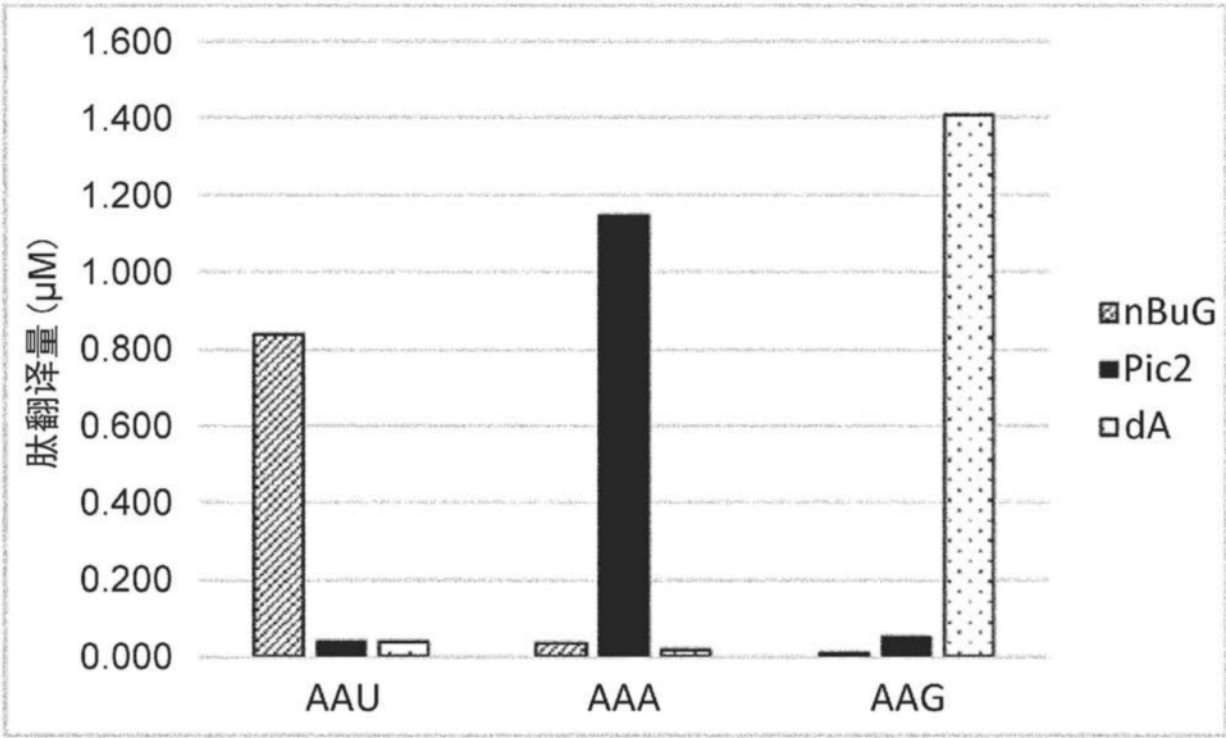


图4

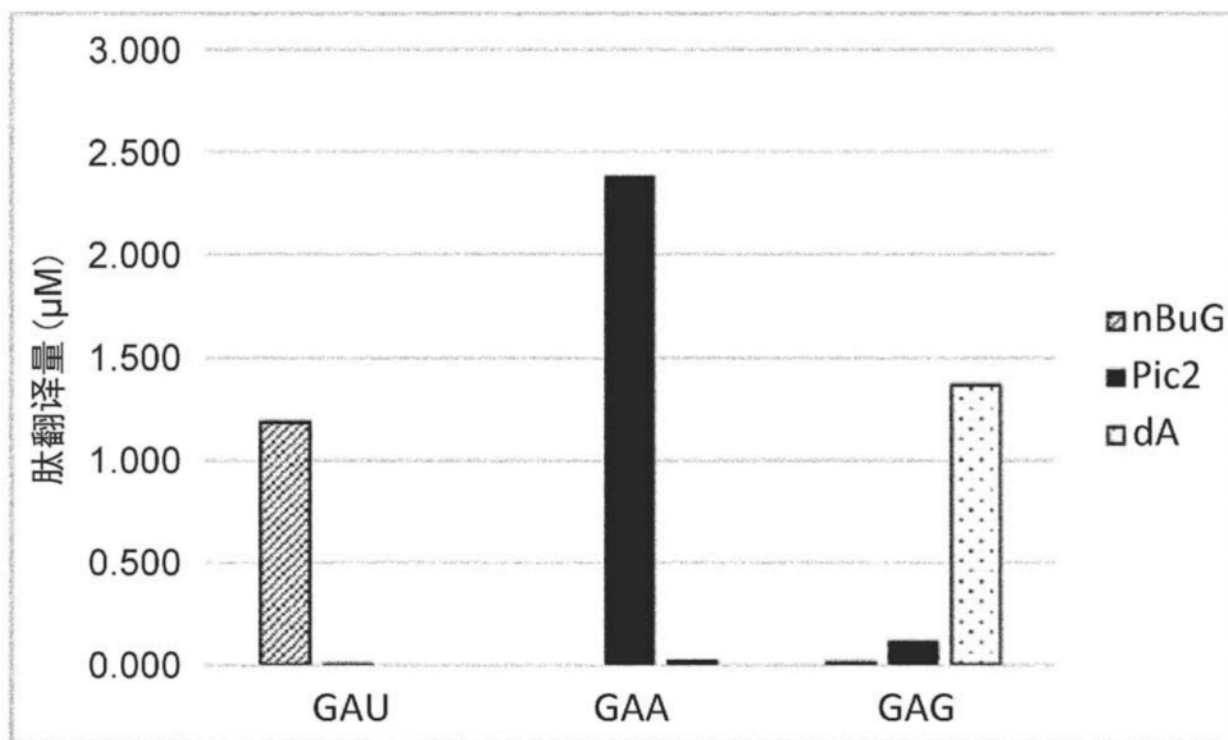


图5

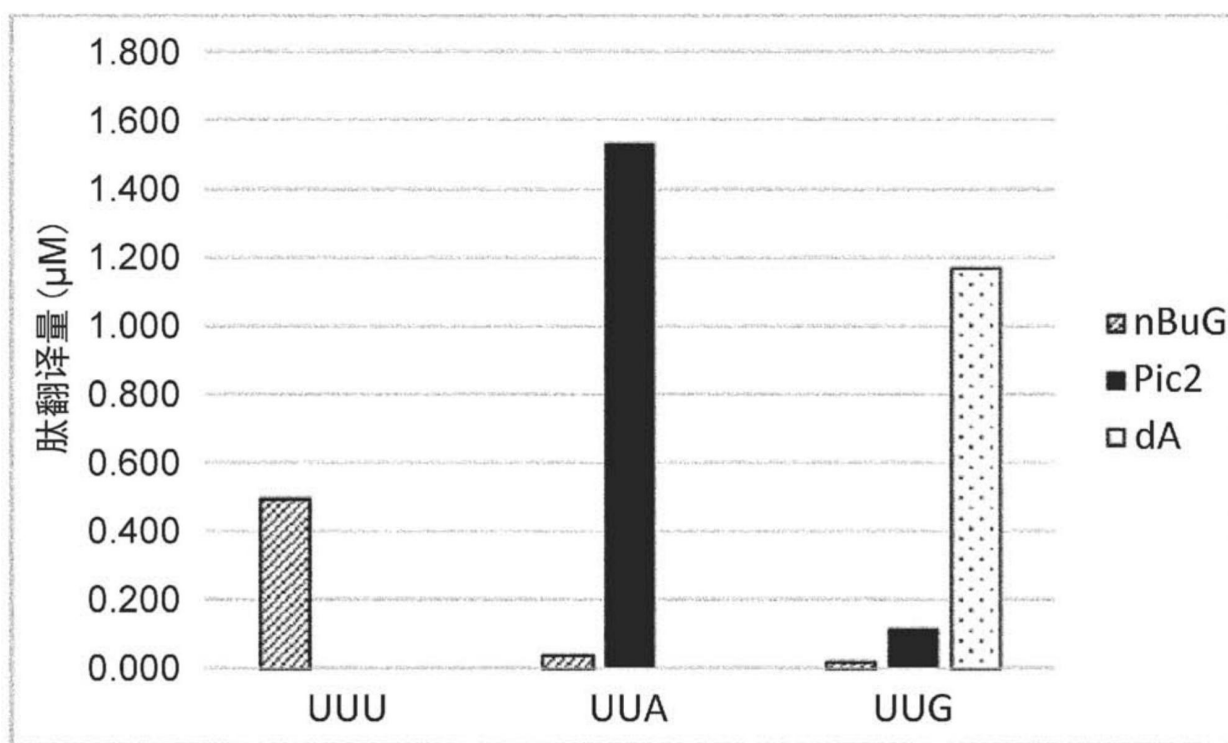


图6

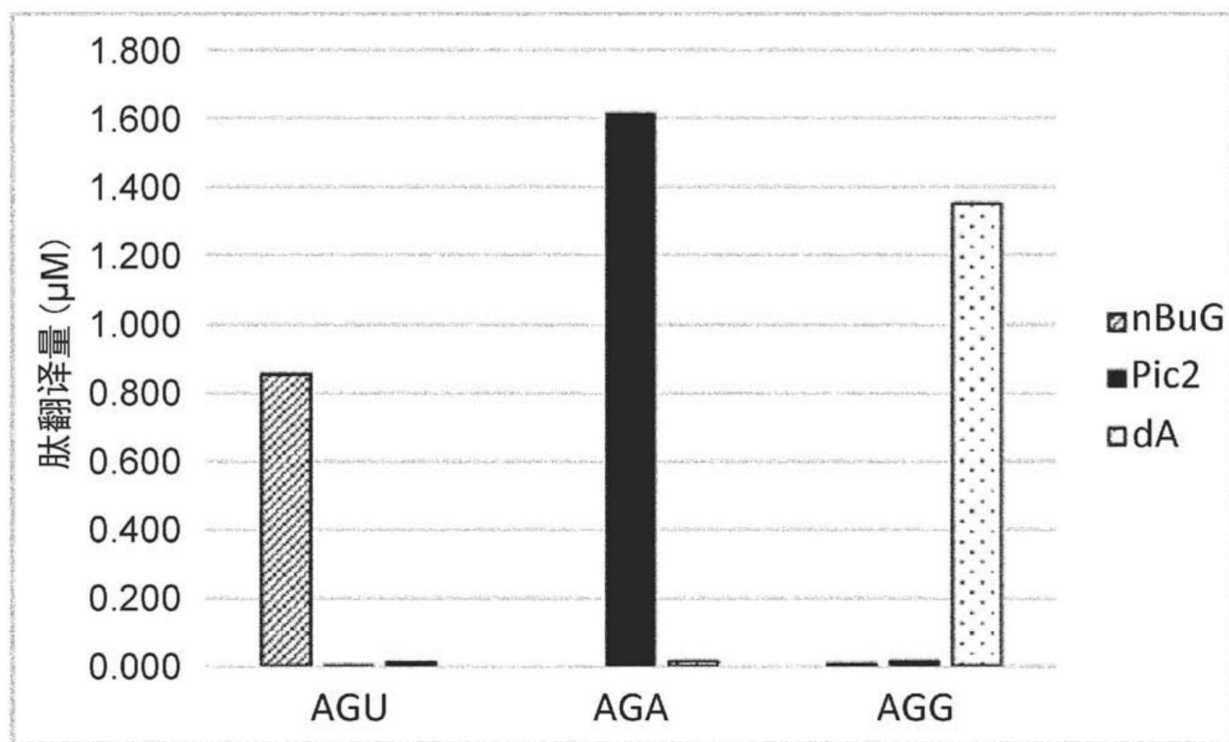


图7

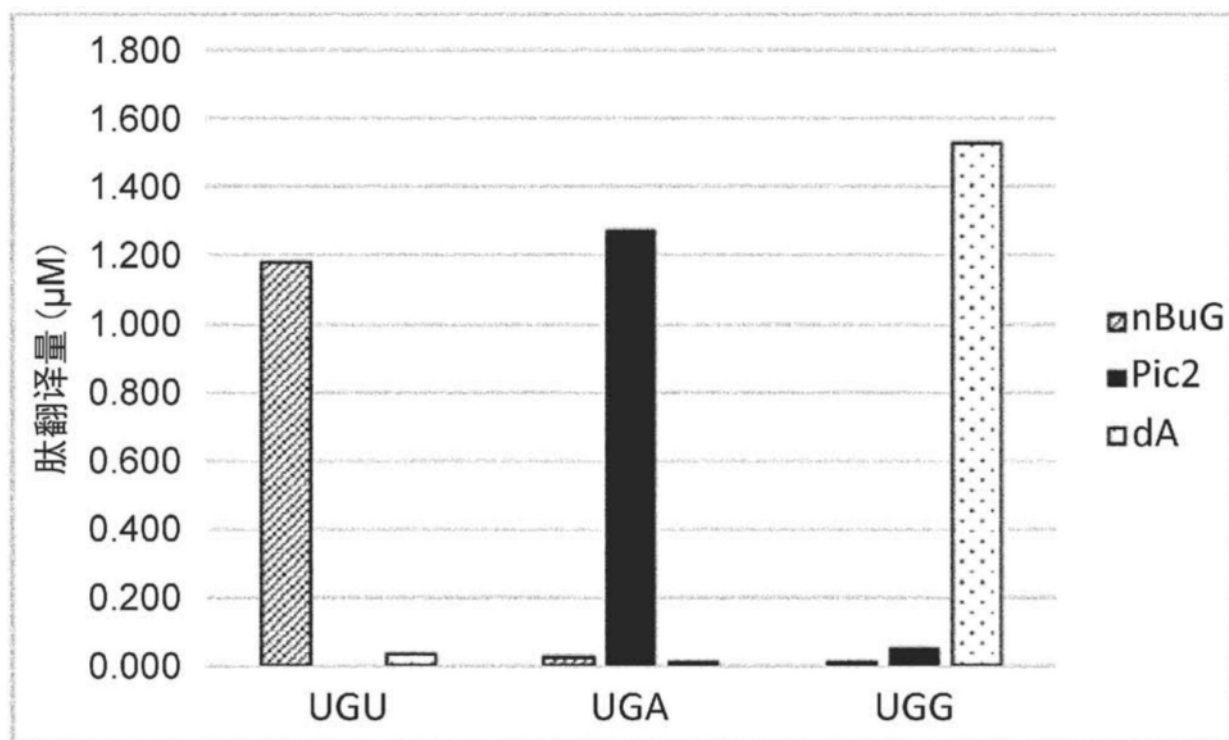


图8

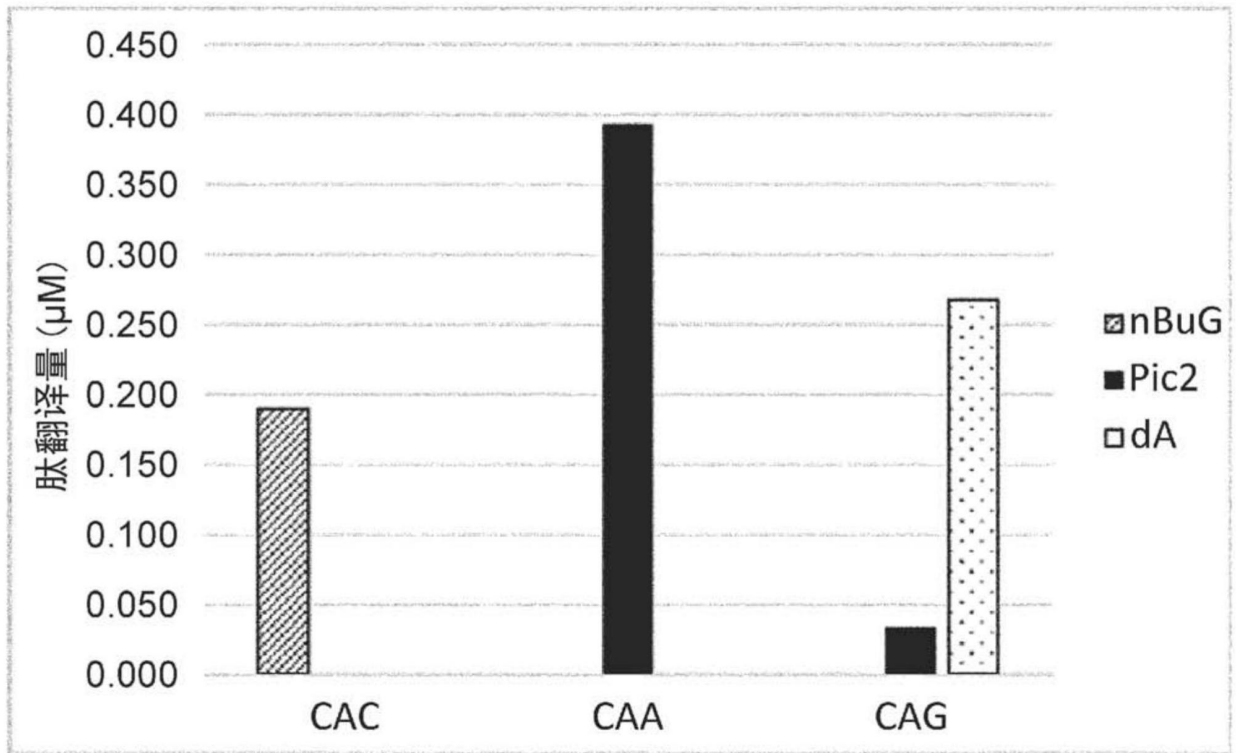


图9

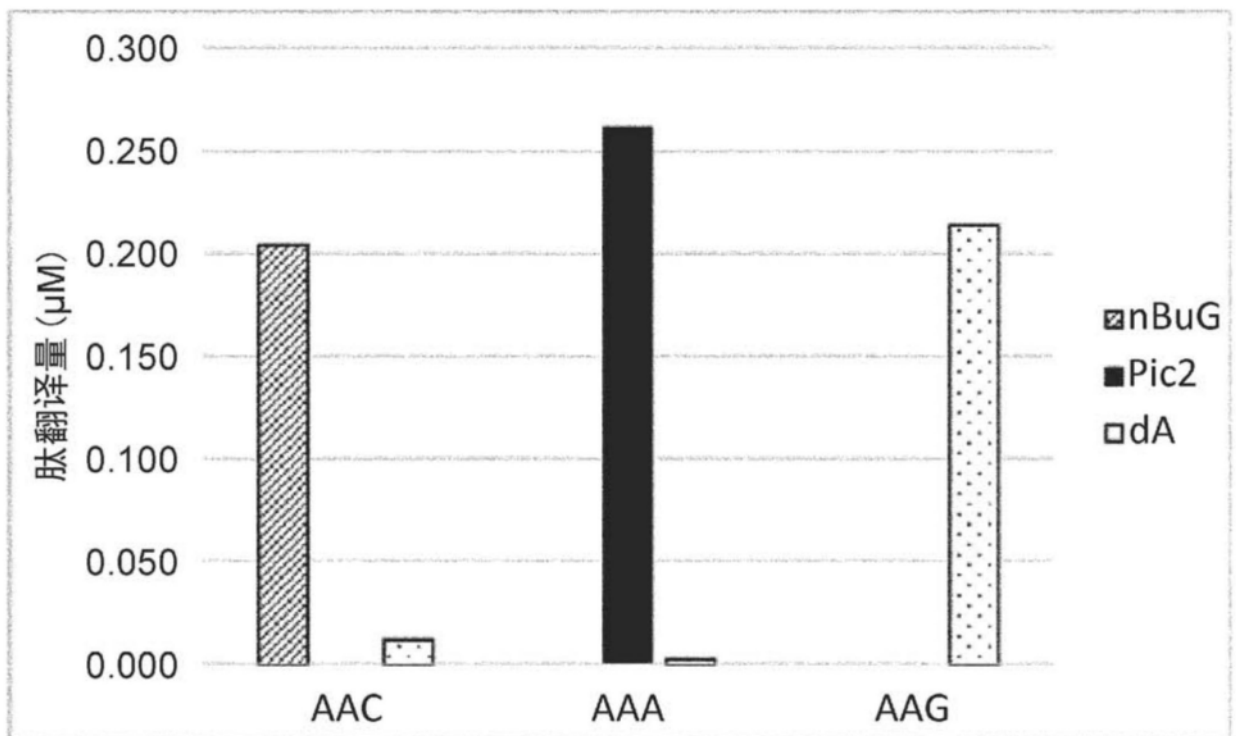


图10

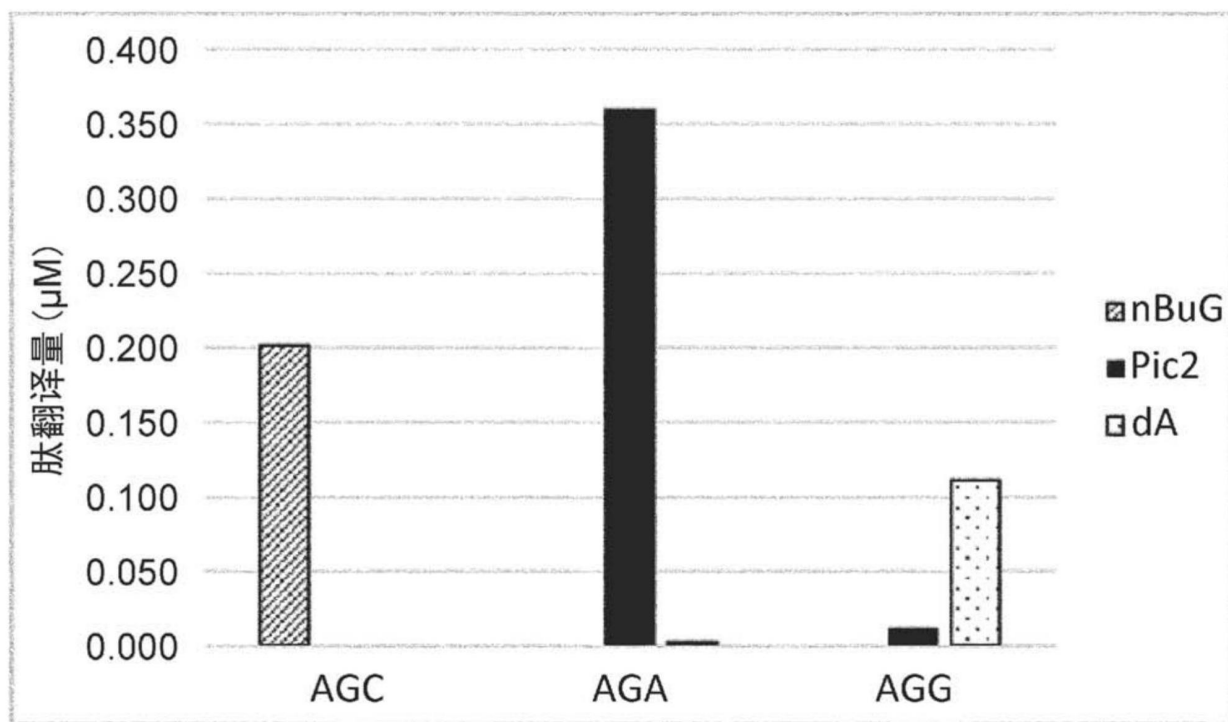


图11

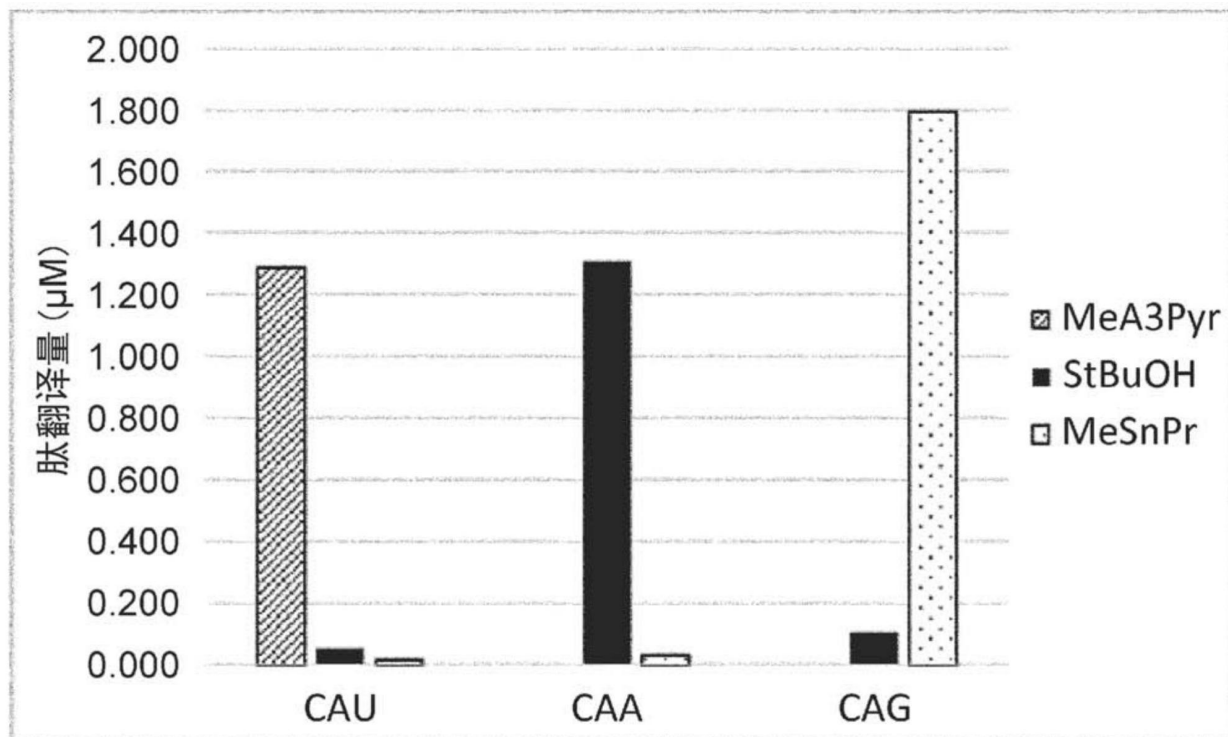


图12

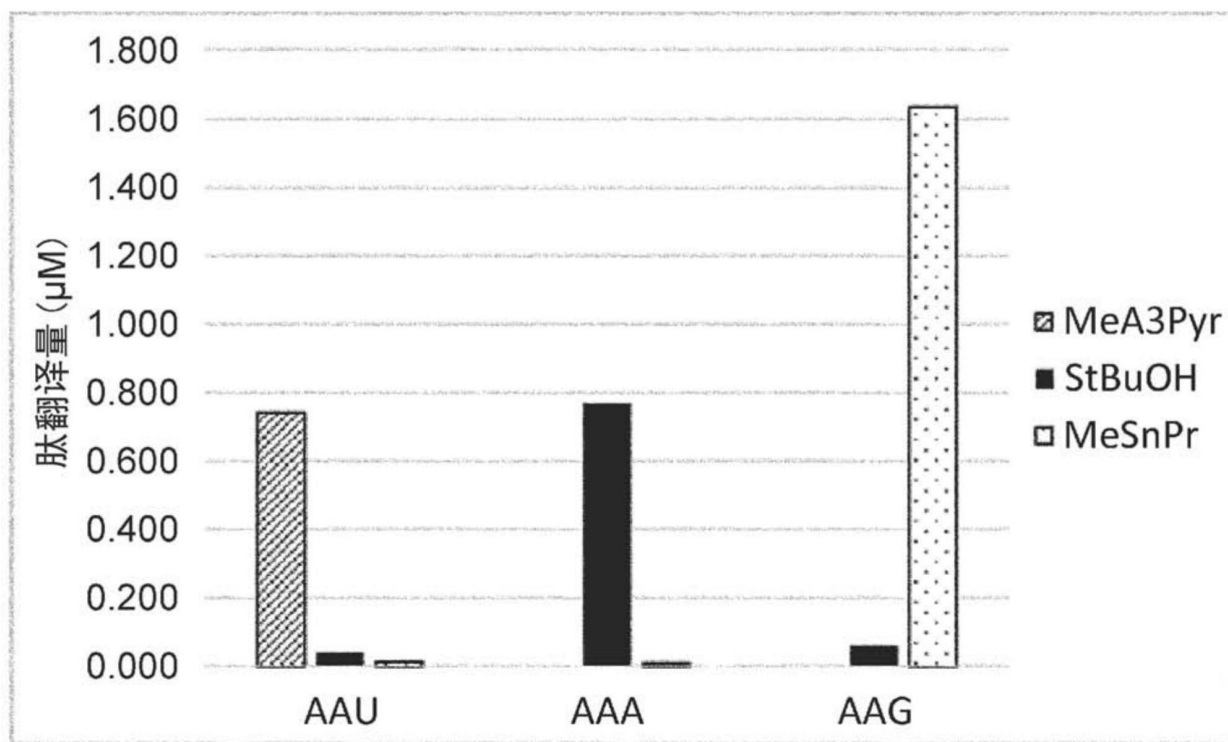


图13

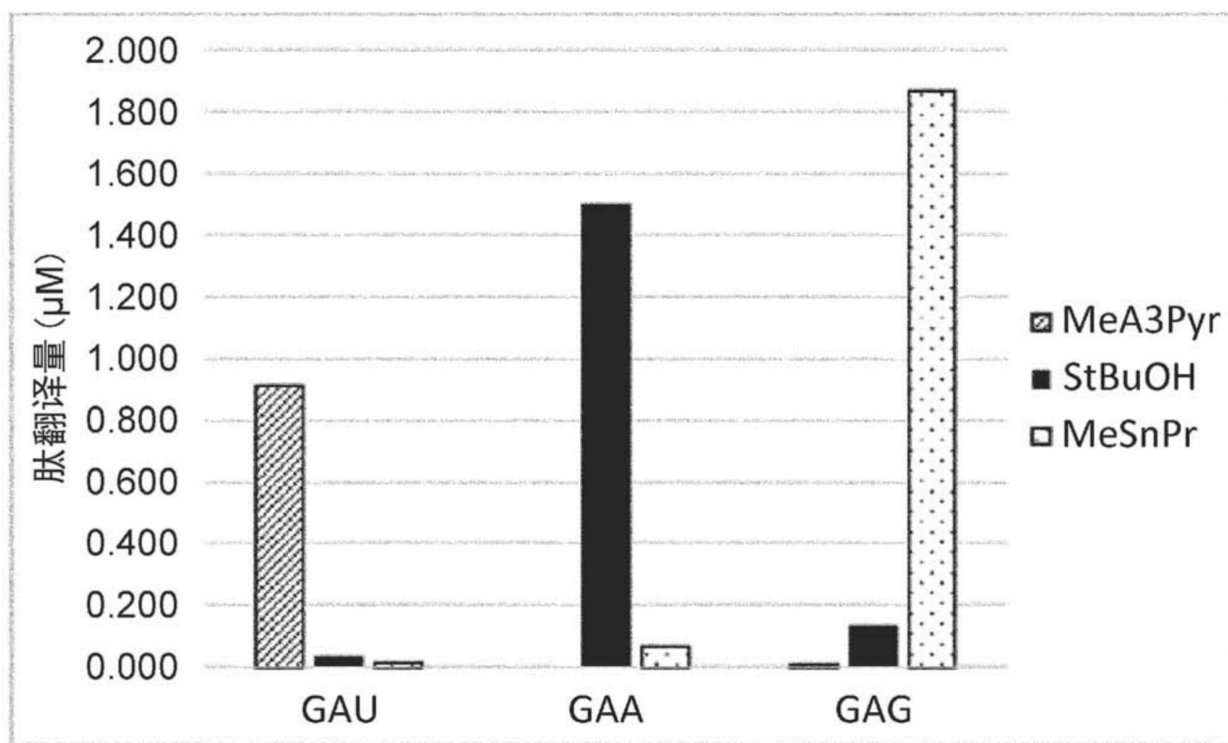


图14

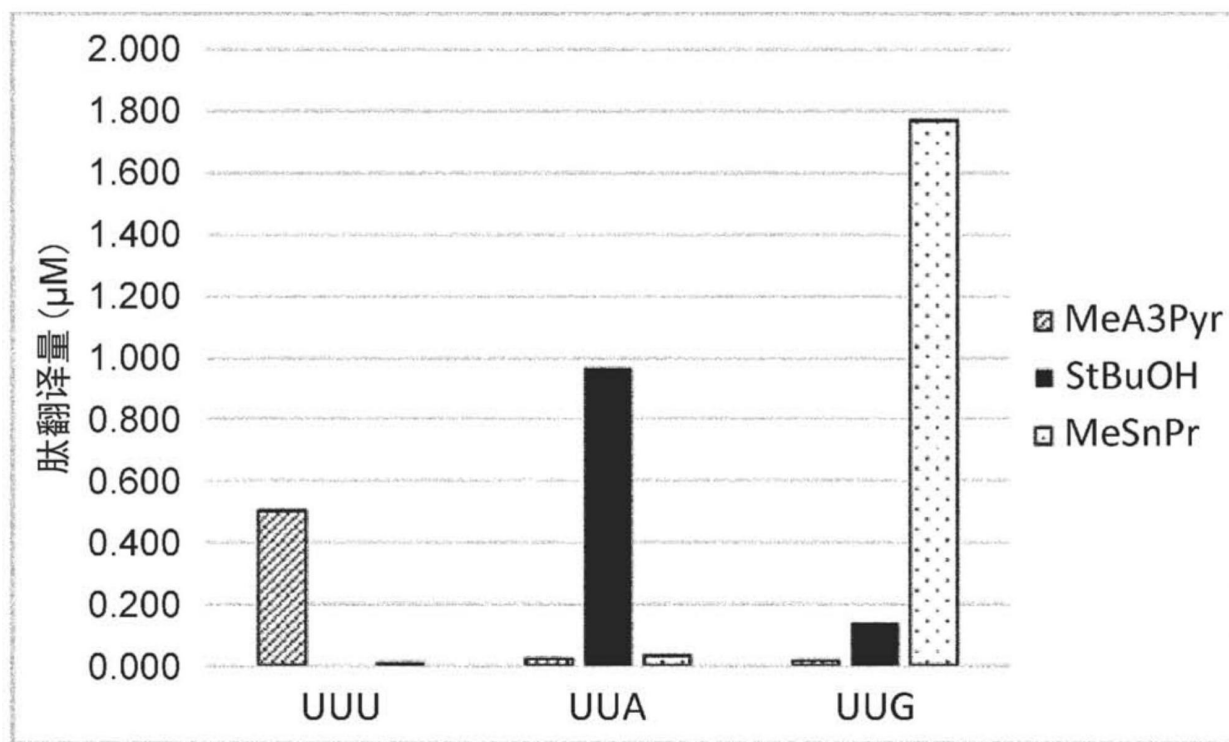


图15

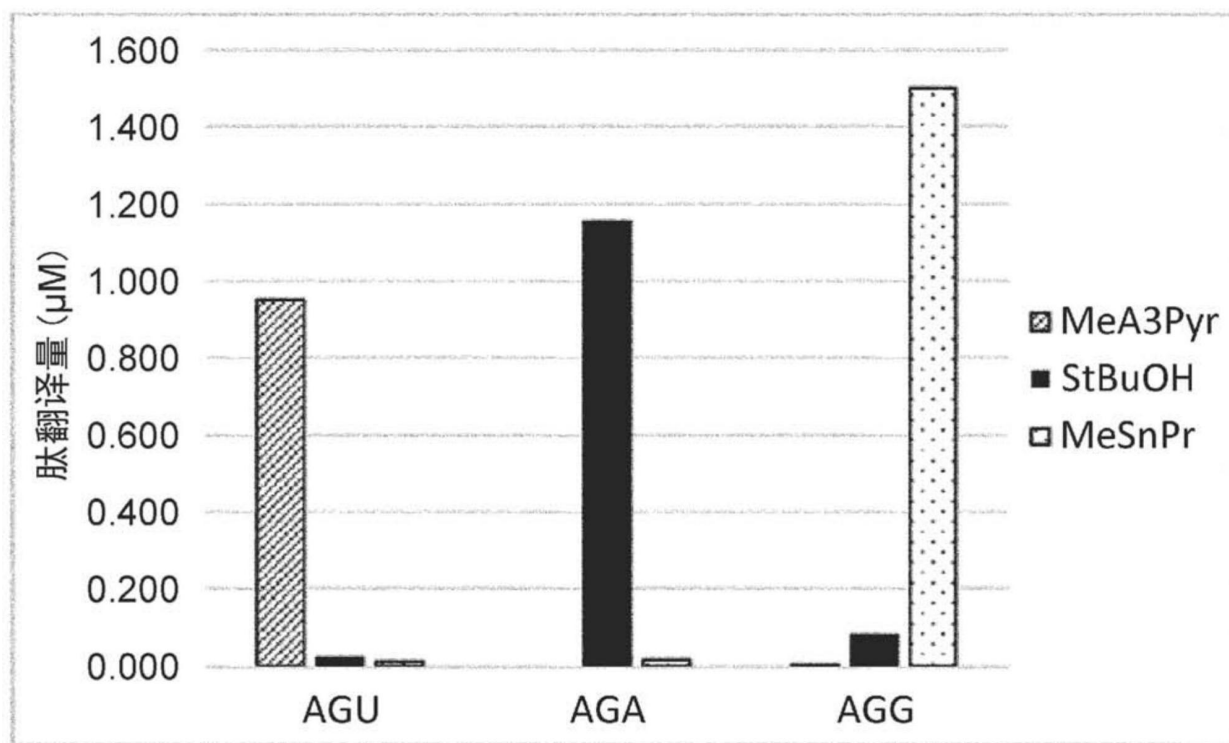


图16

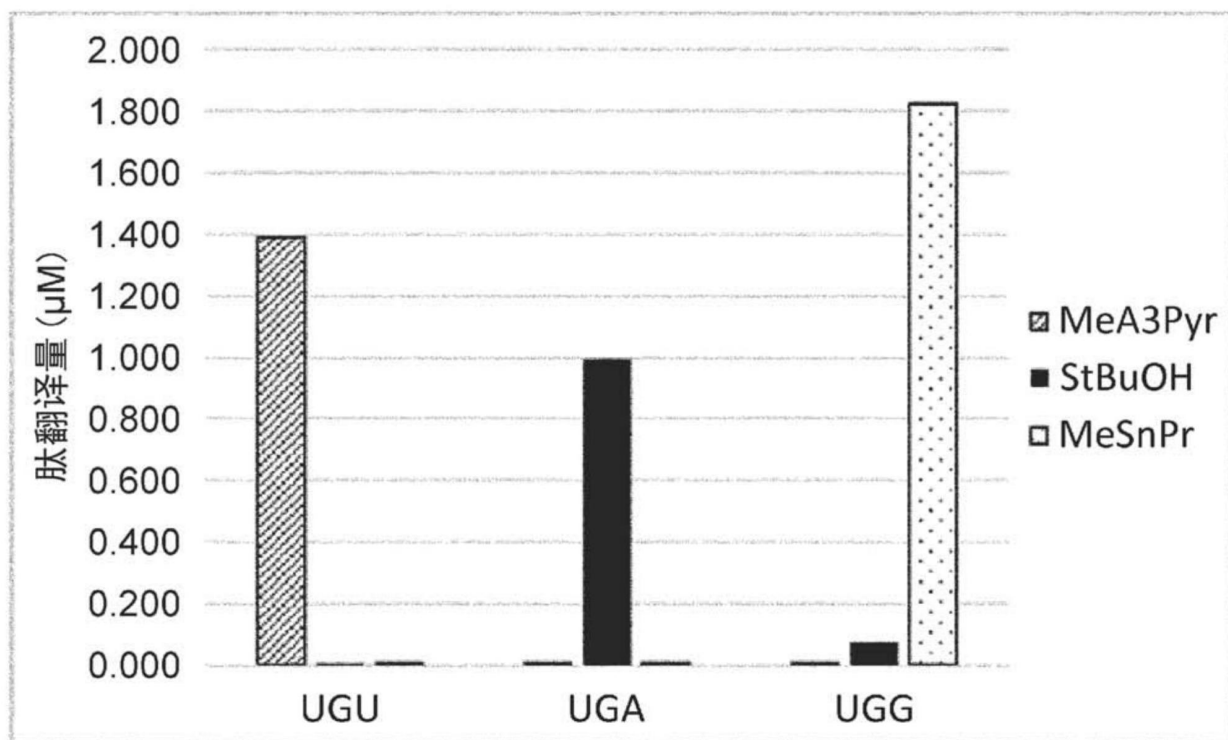


图17

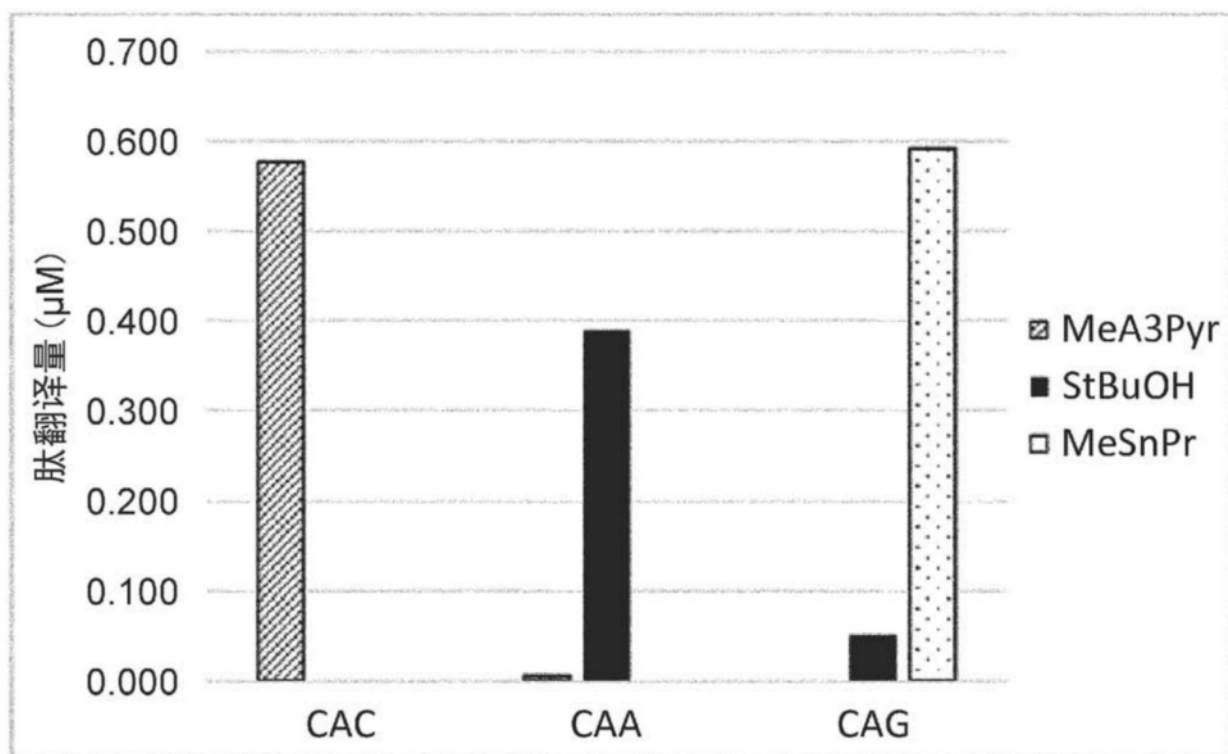


图18

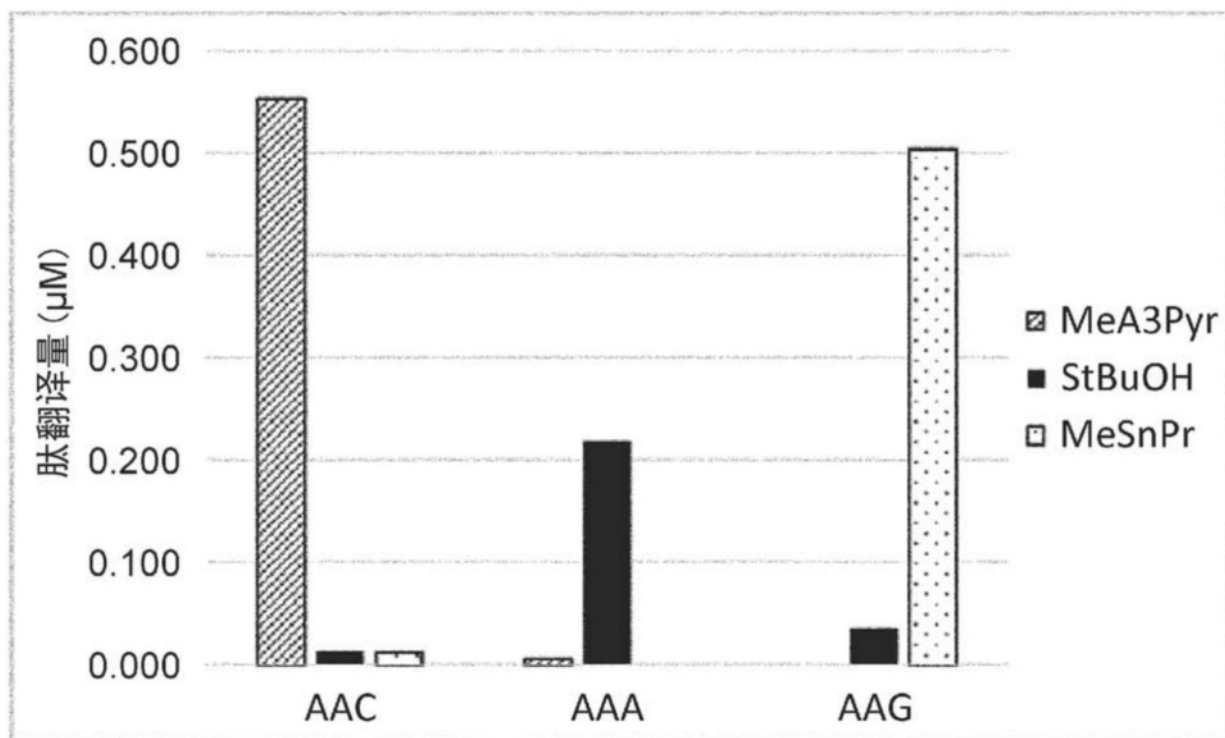


图19

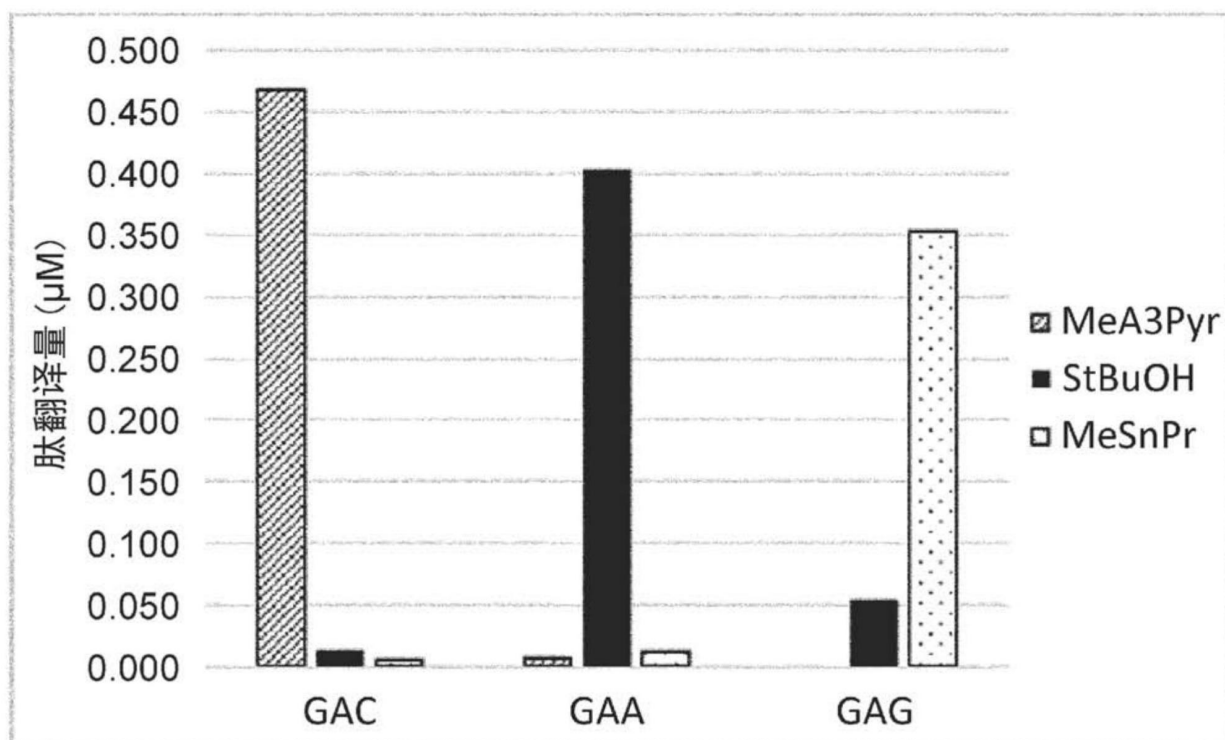


图20

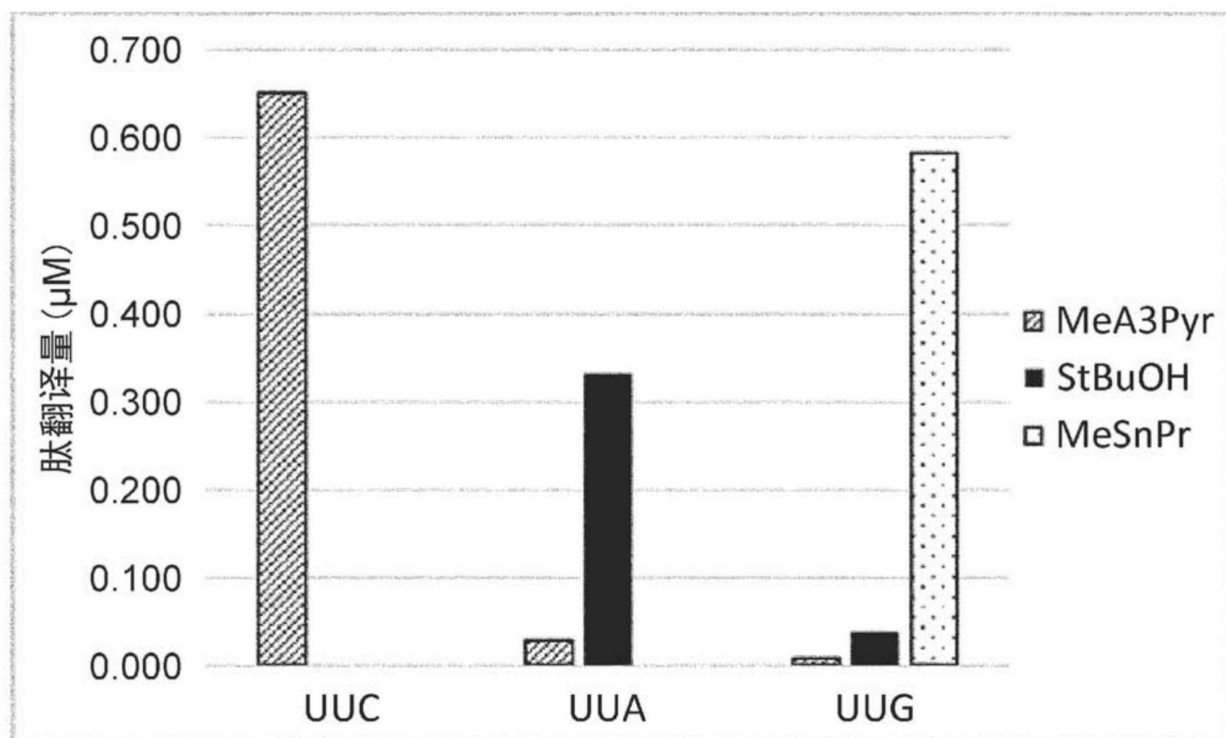


图21

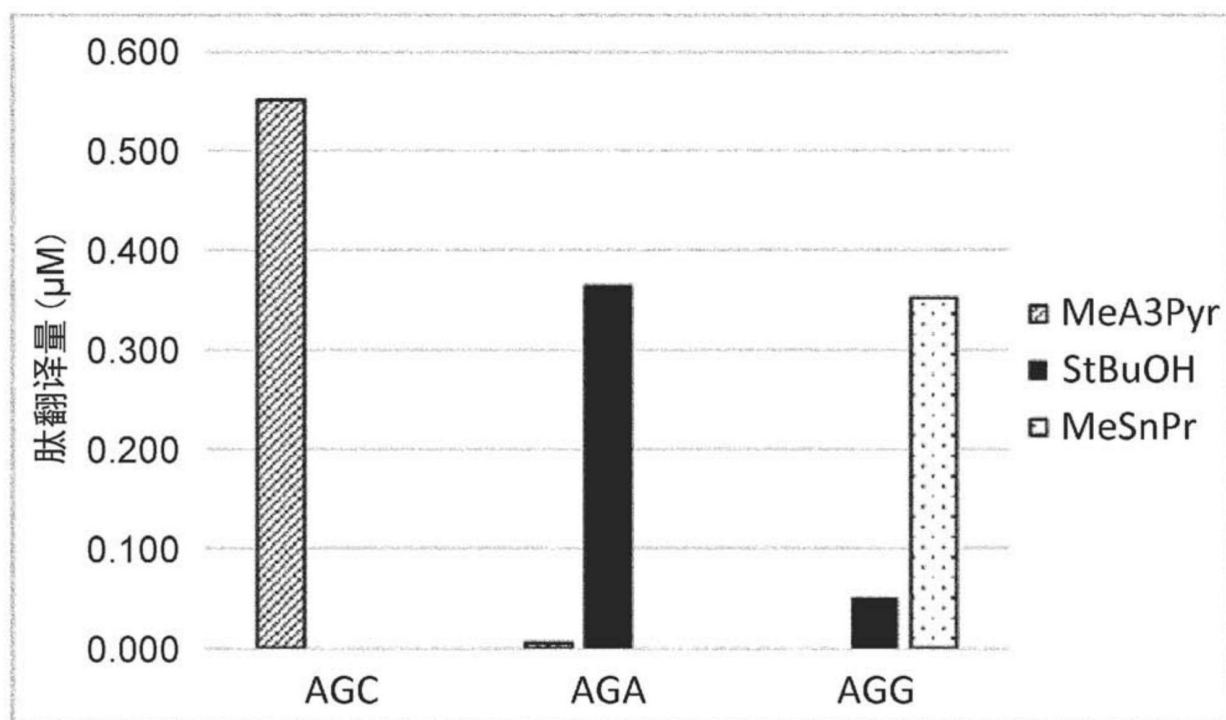


图22

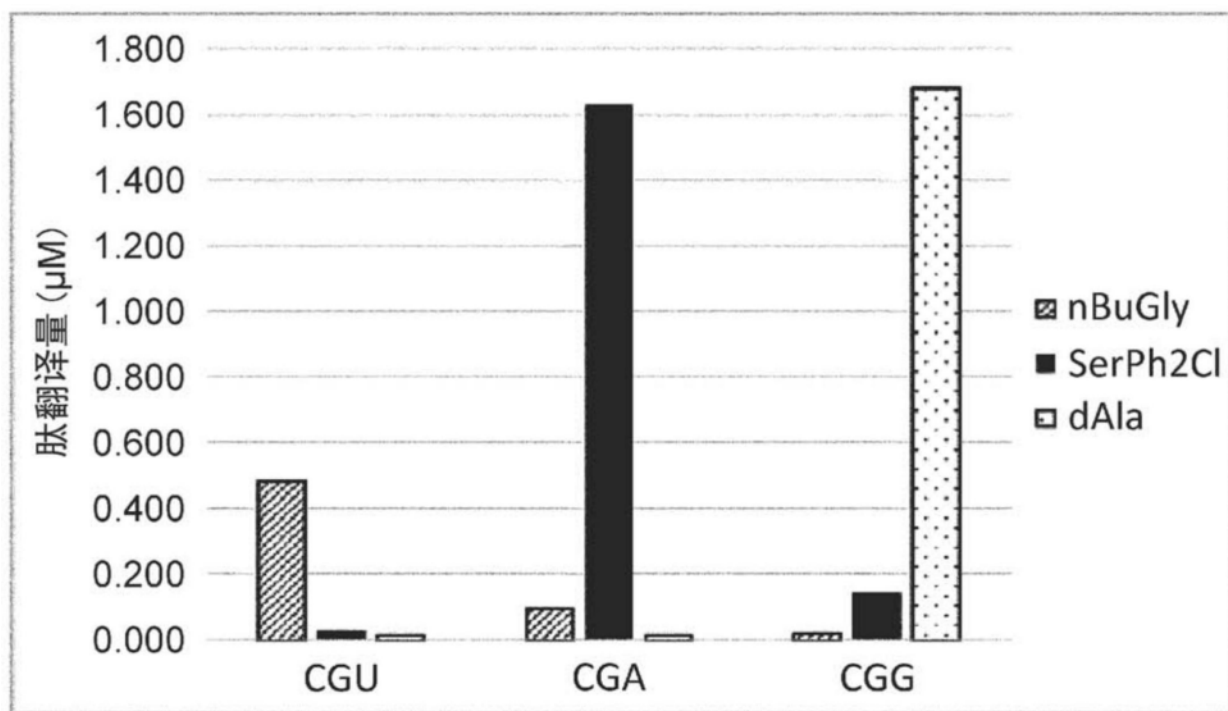


图23-1

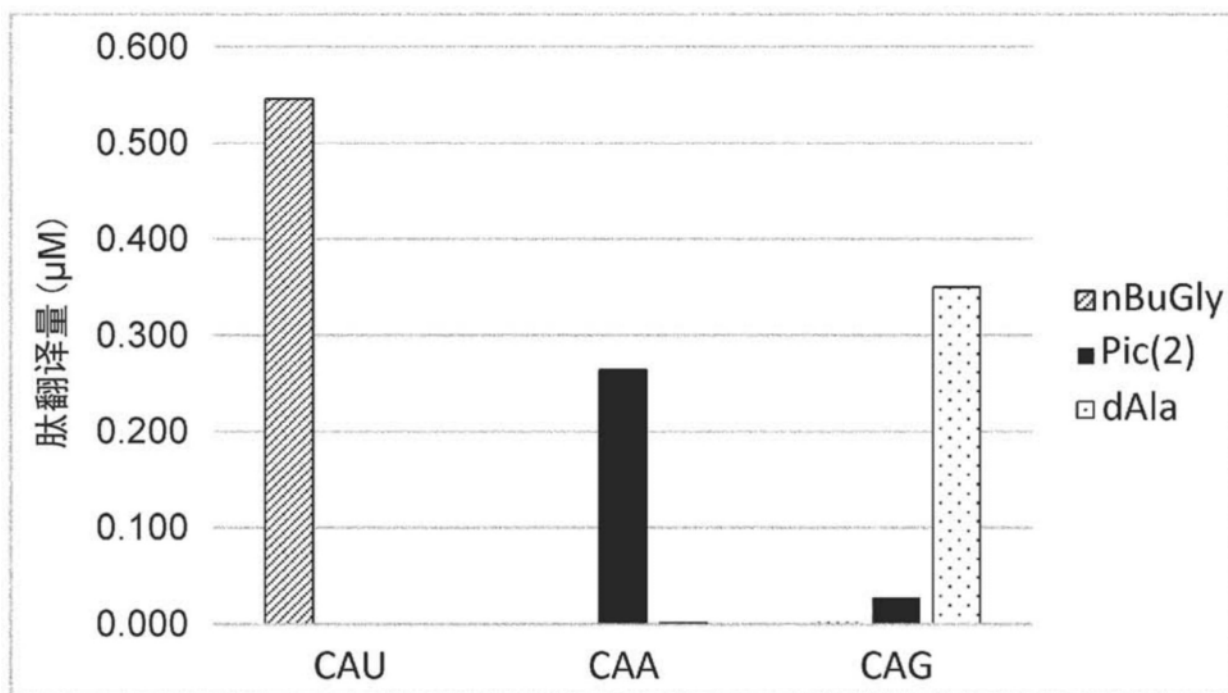


图23-2

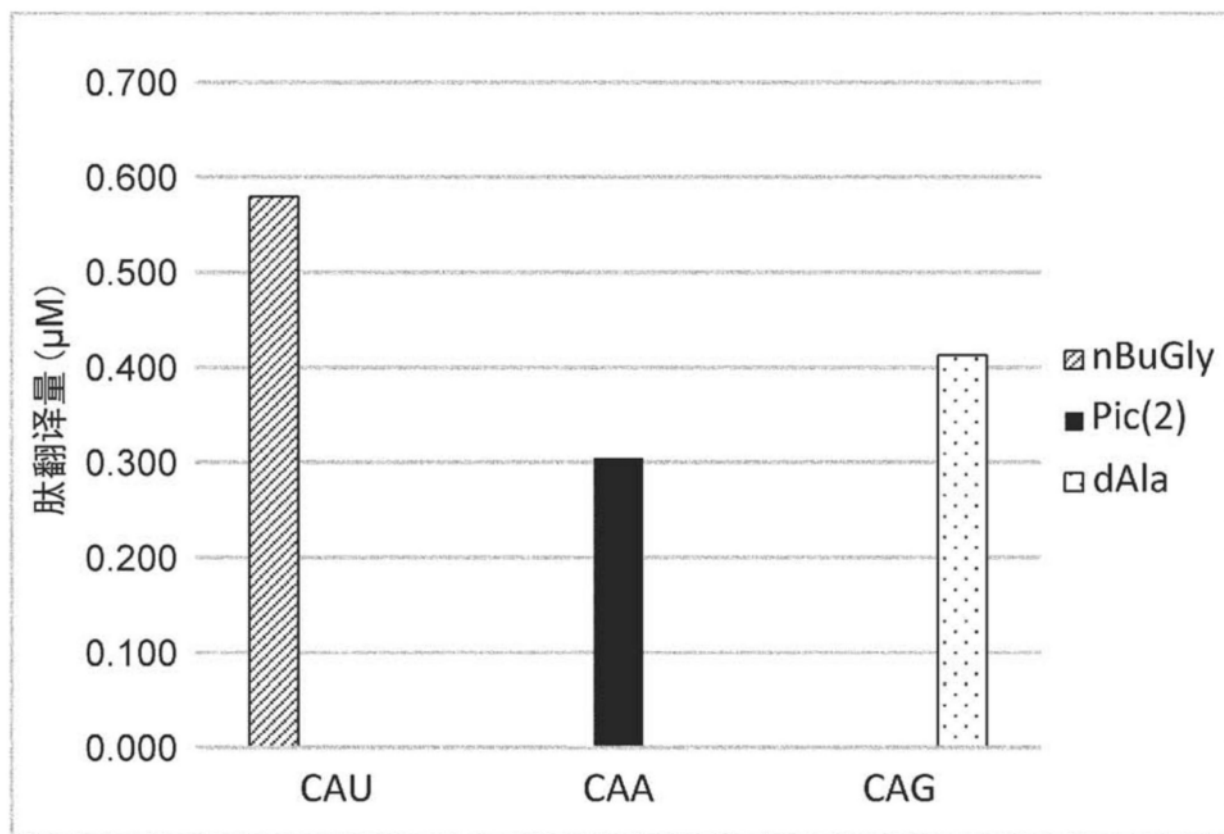


图23-3

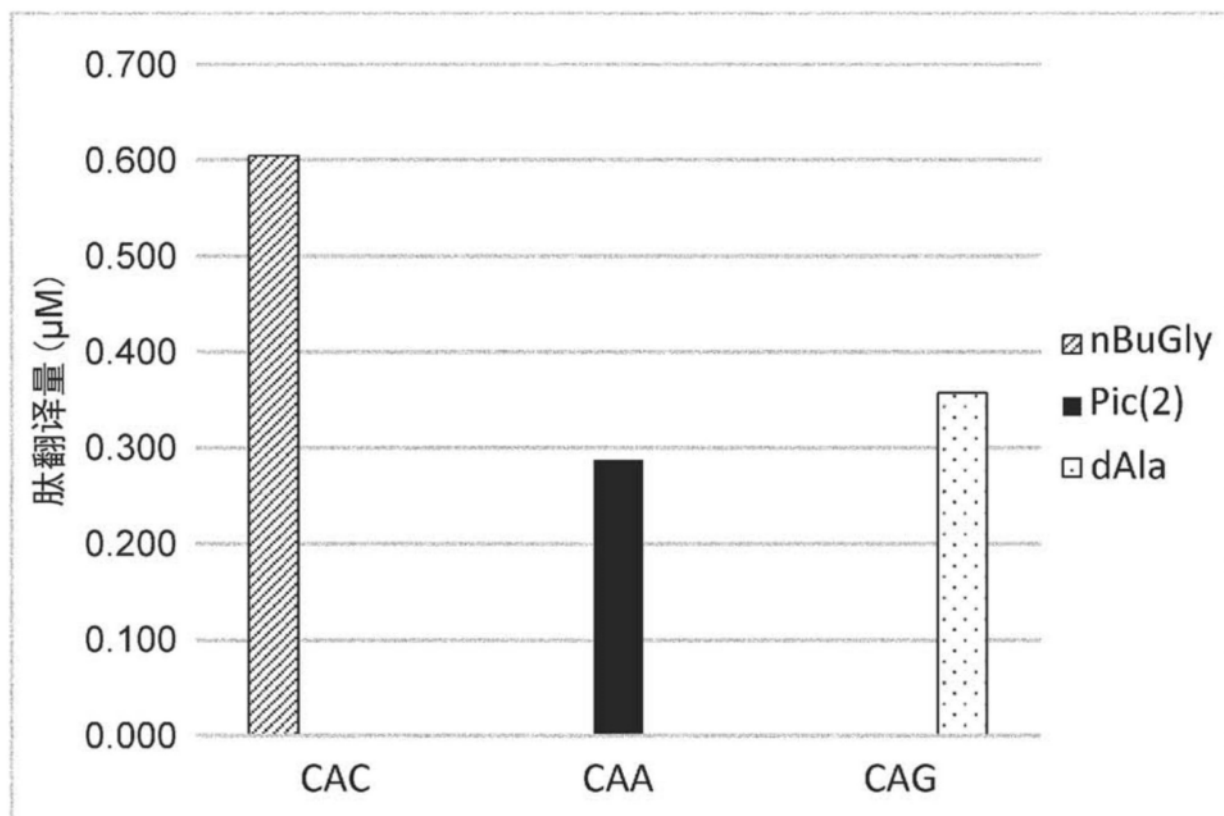


图23-4

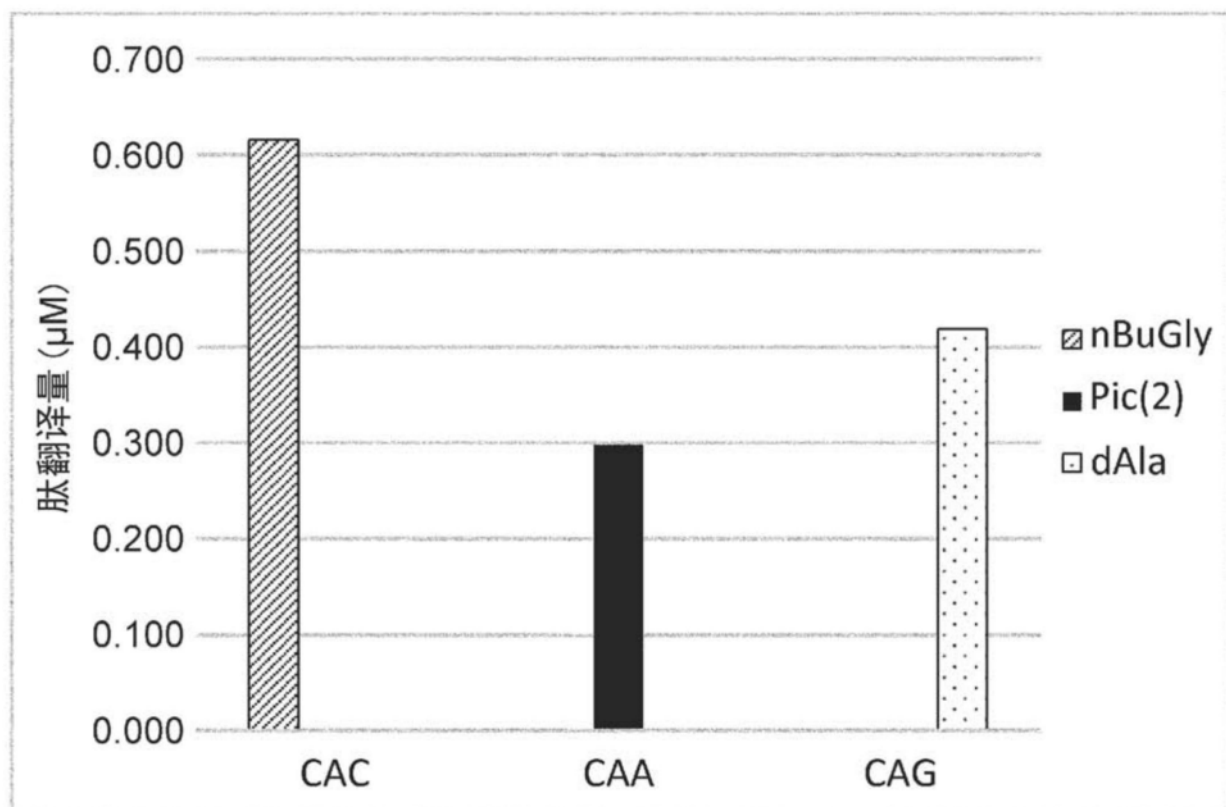


图23-5

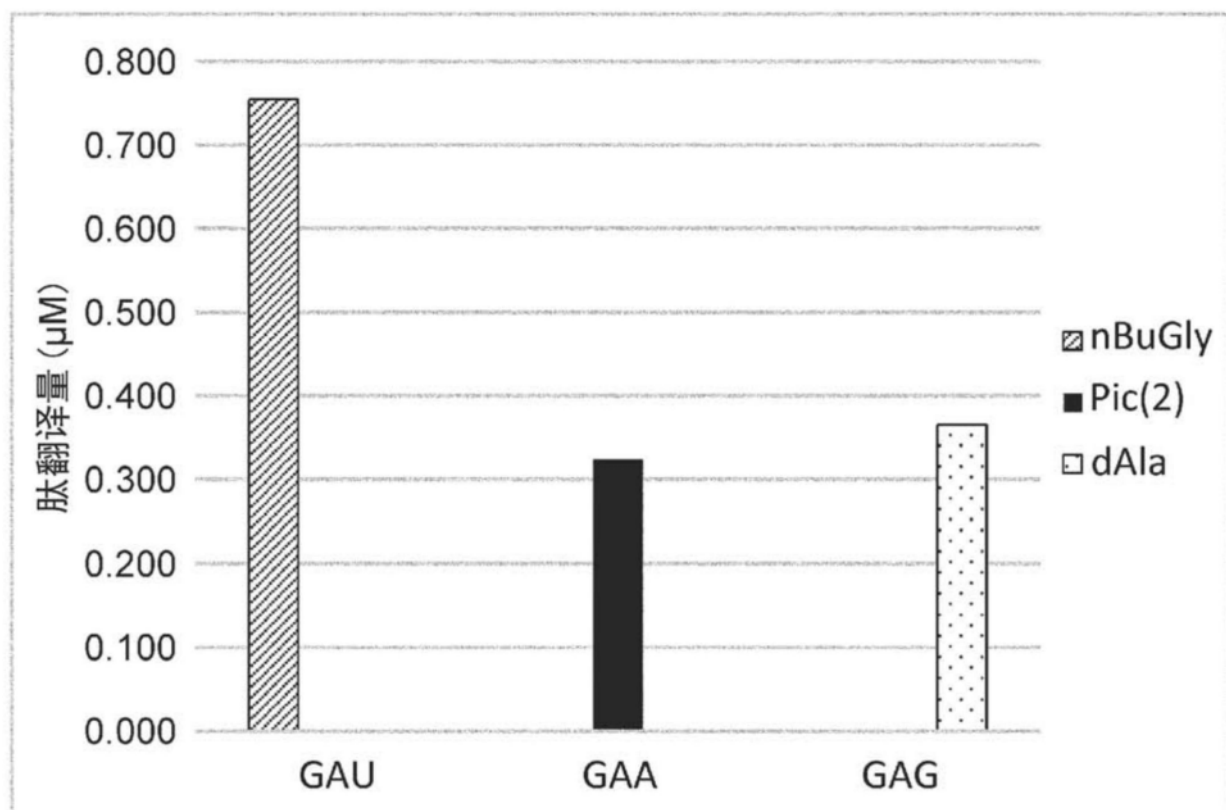


图23-6

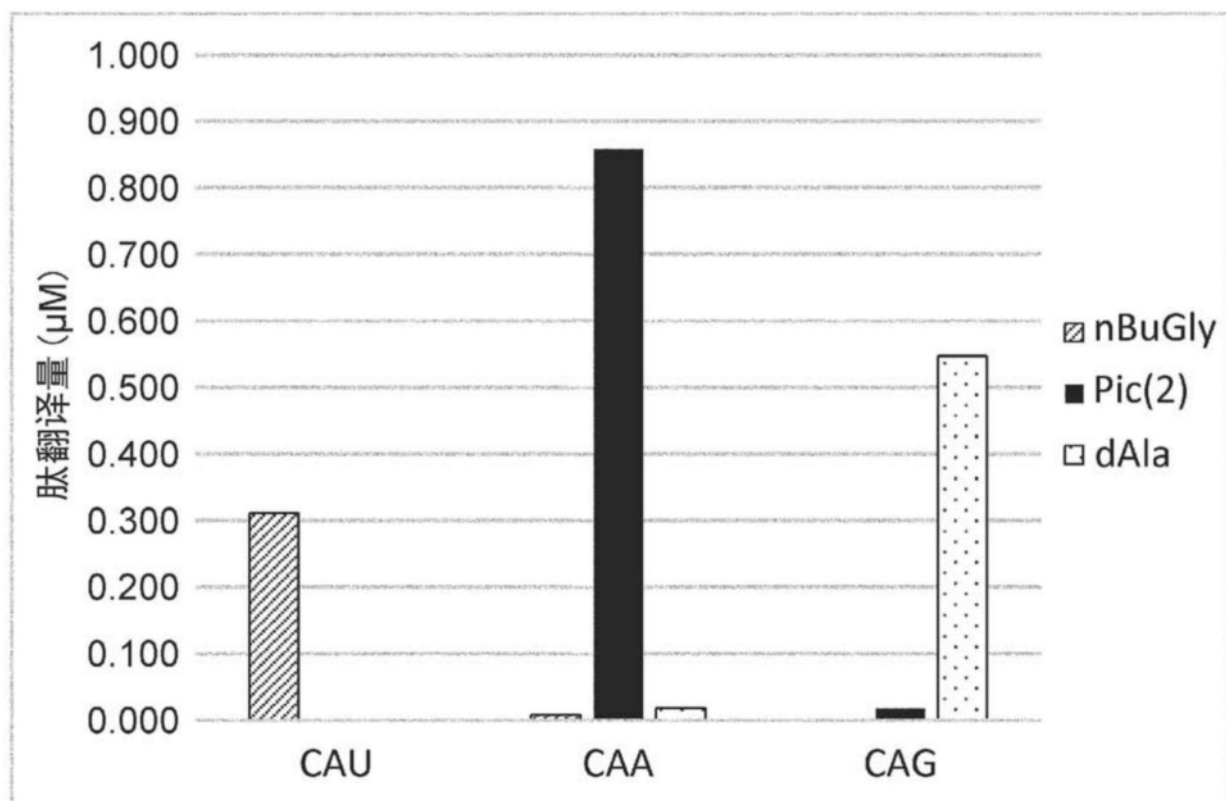


图23-7

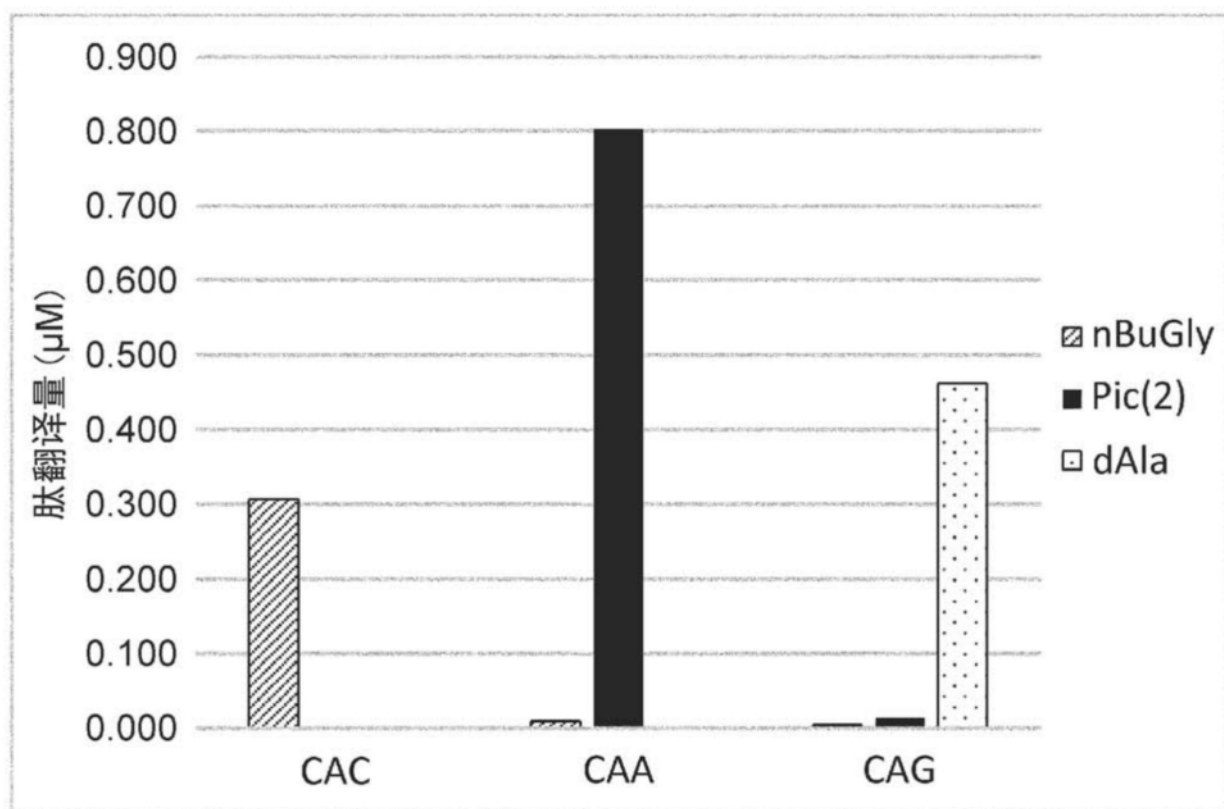


图23-8

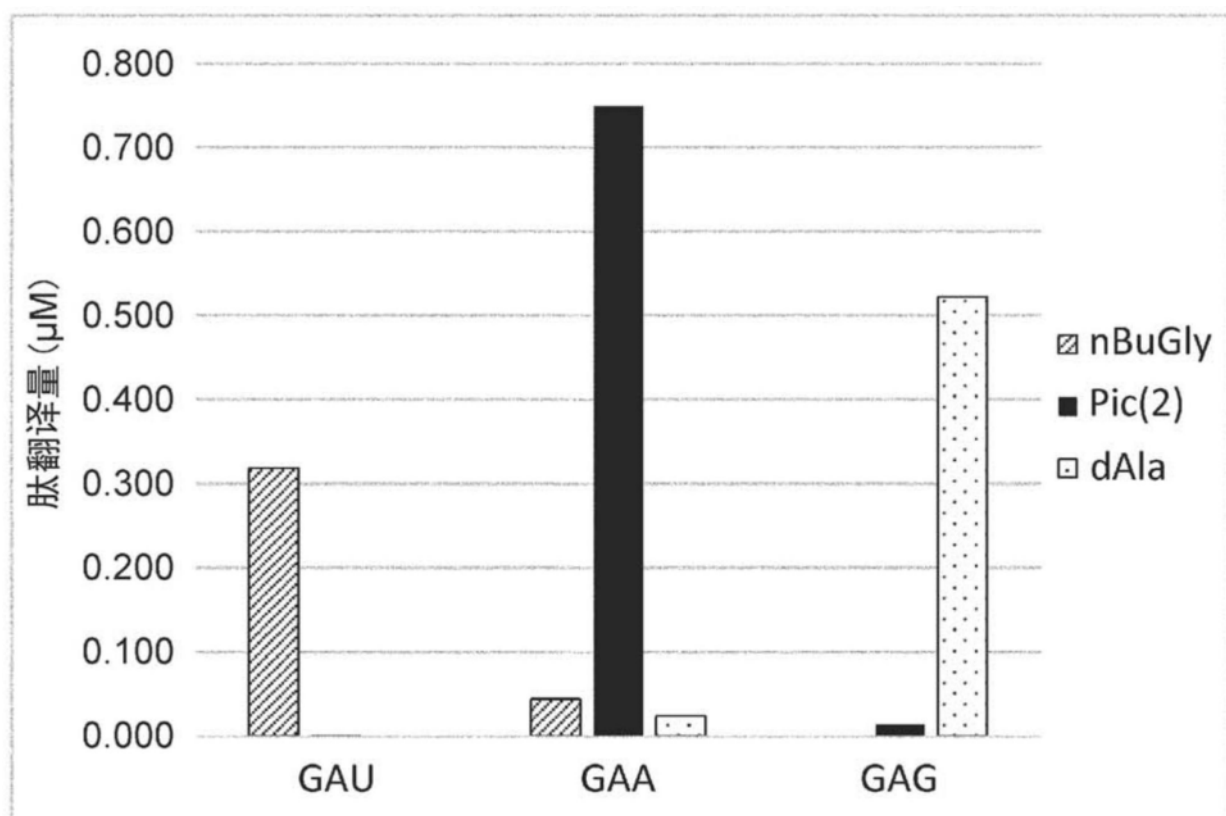


图23-9

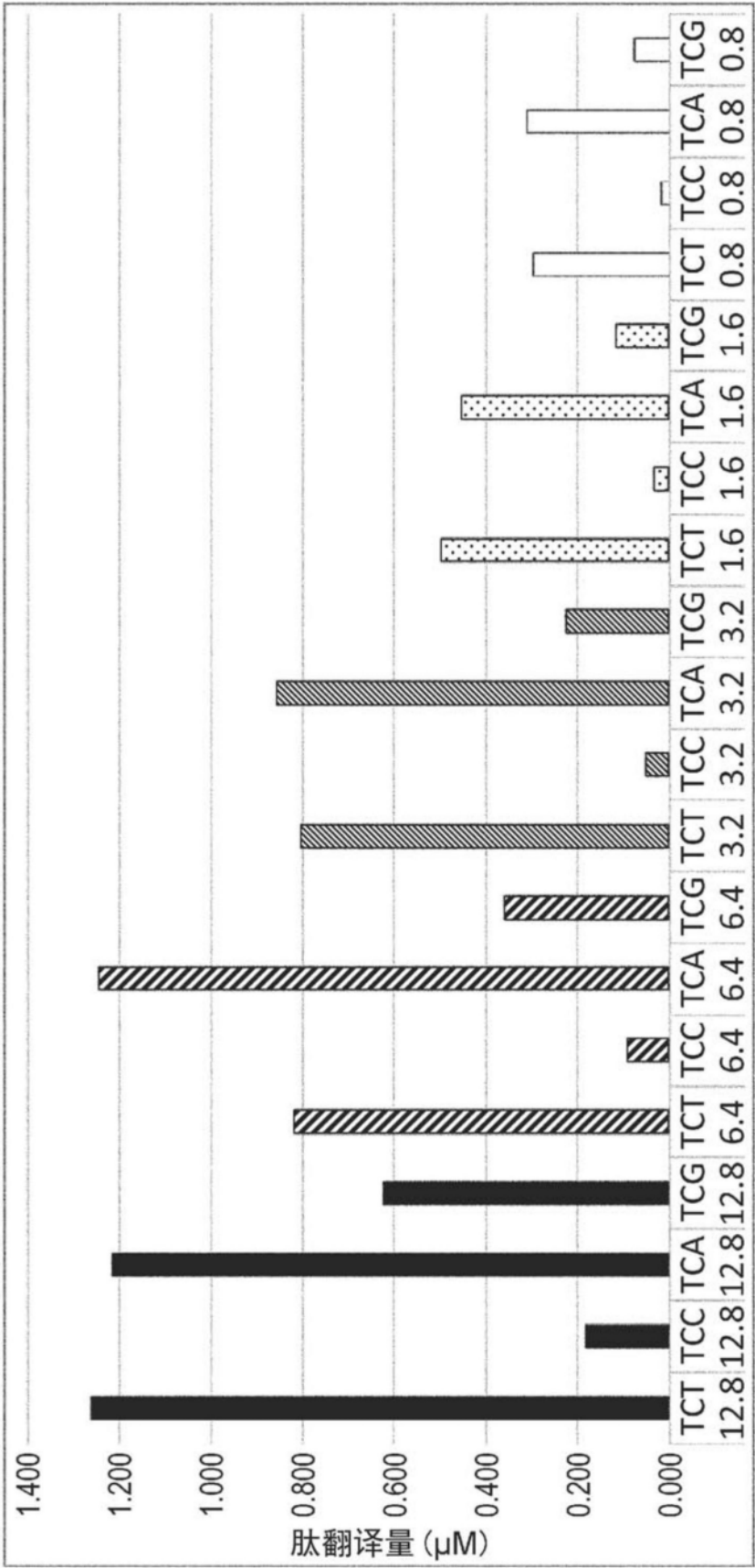


图24-1

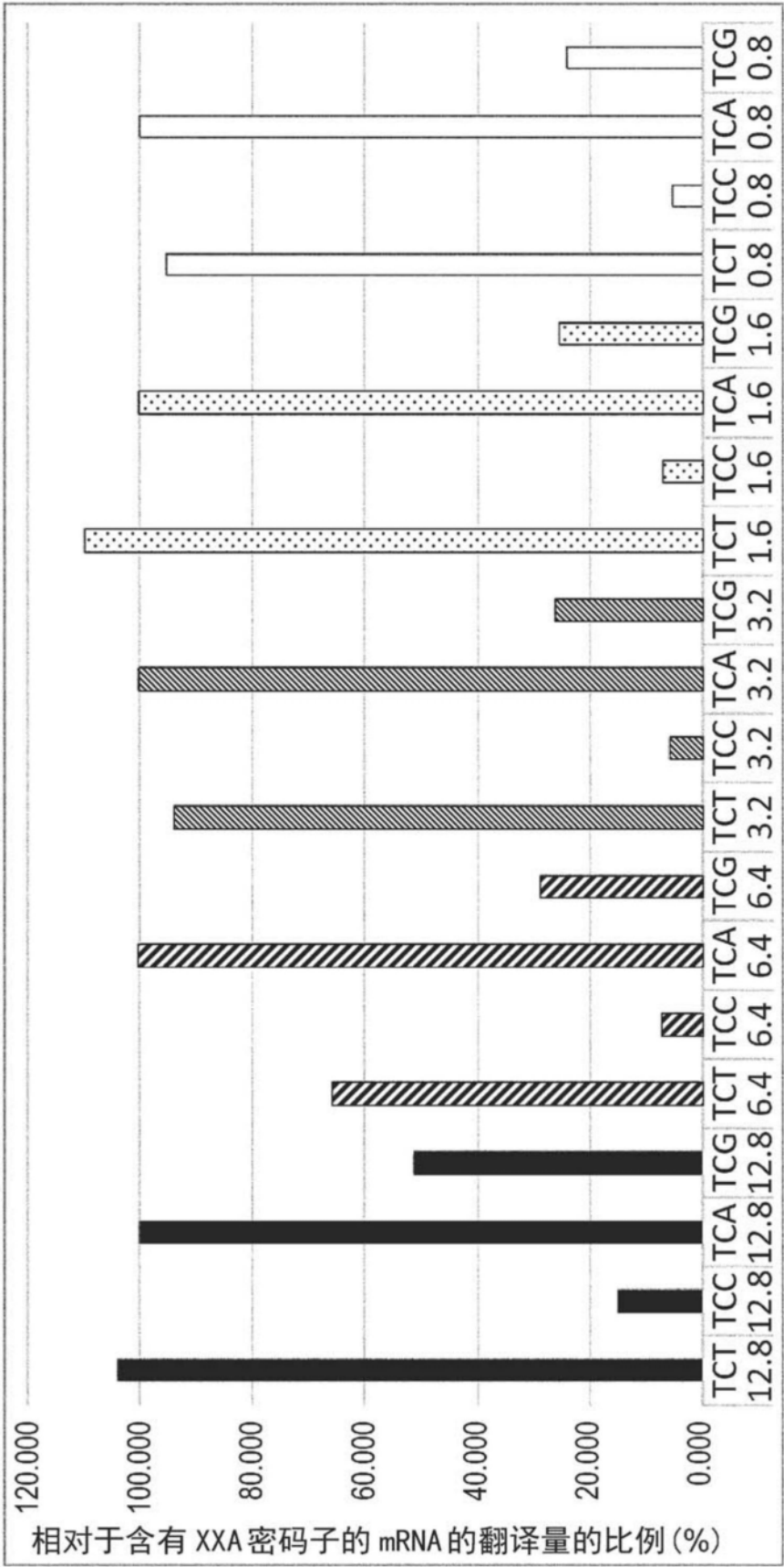


图24-2

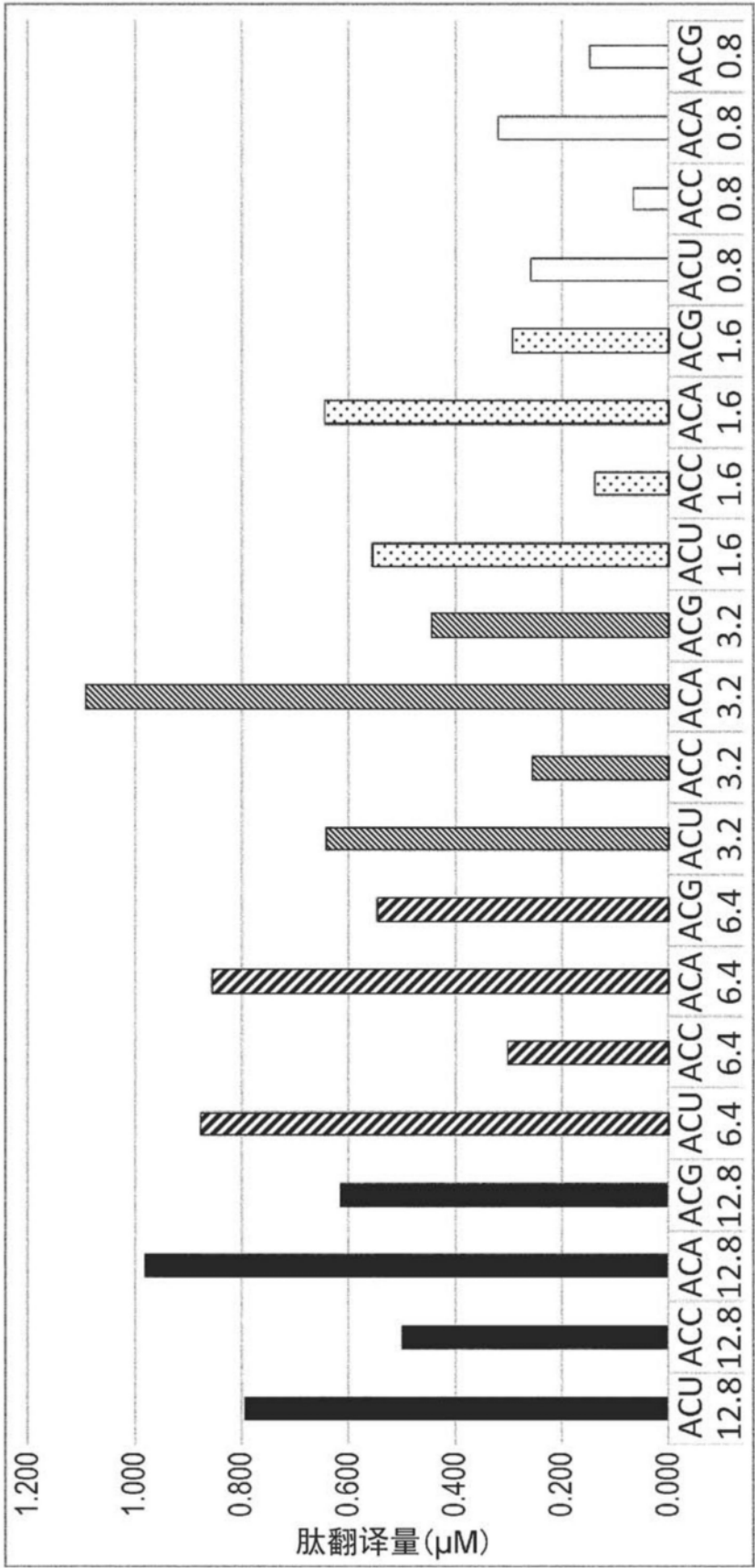


图25-1

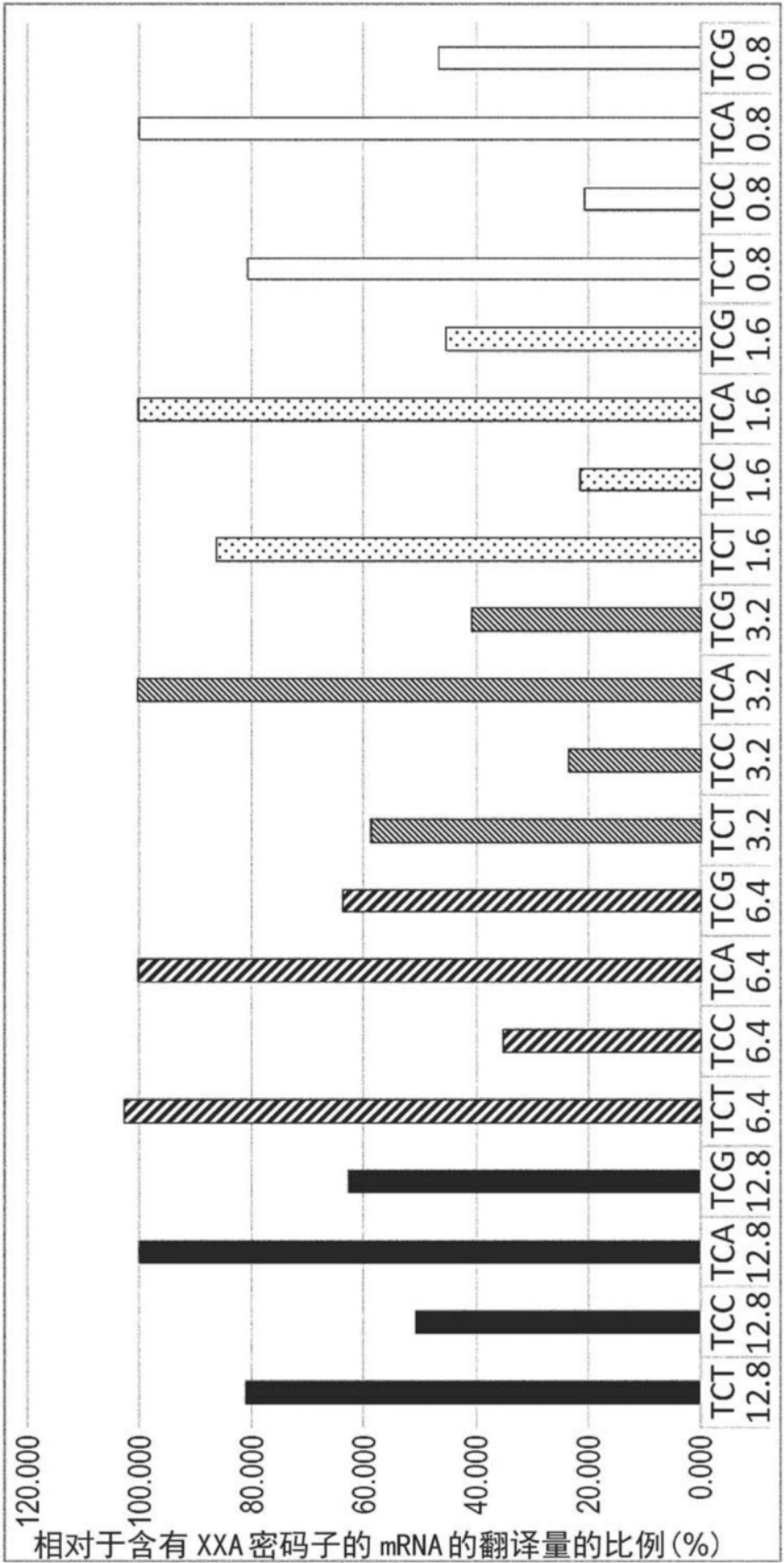


图25-2

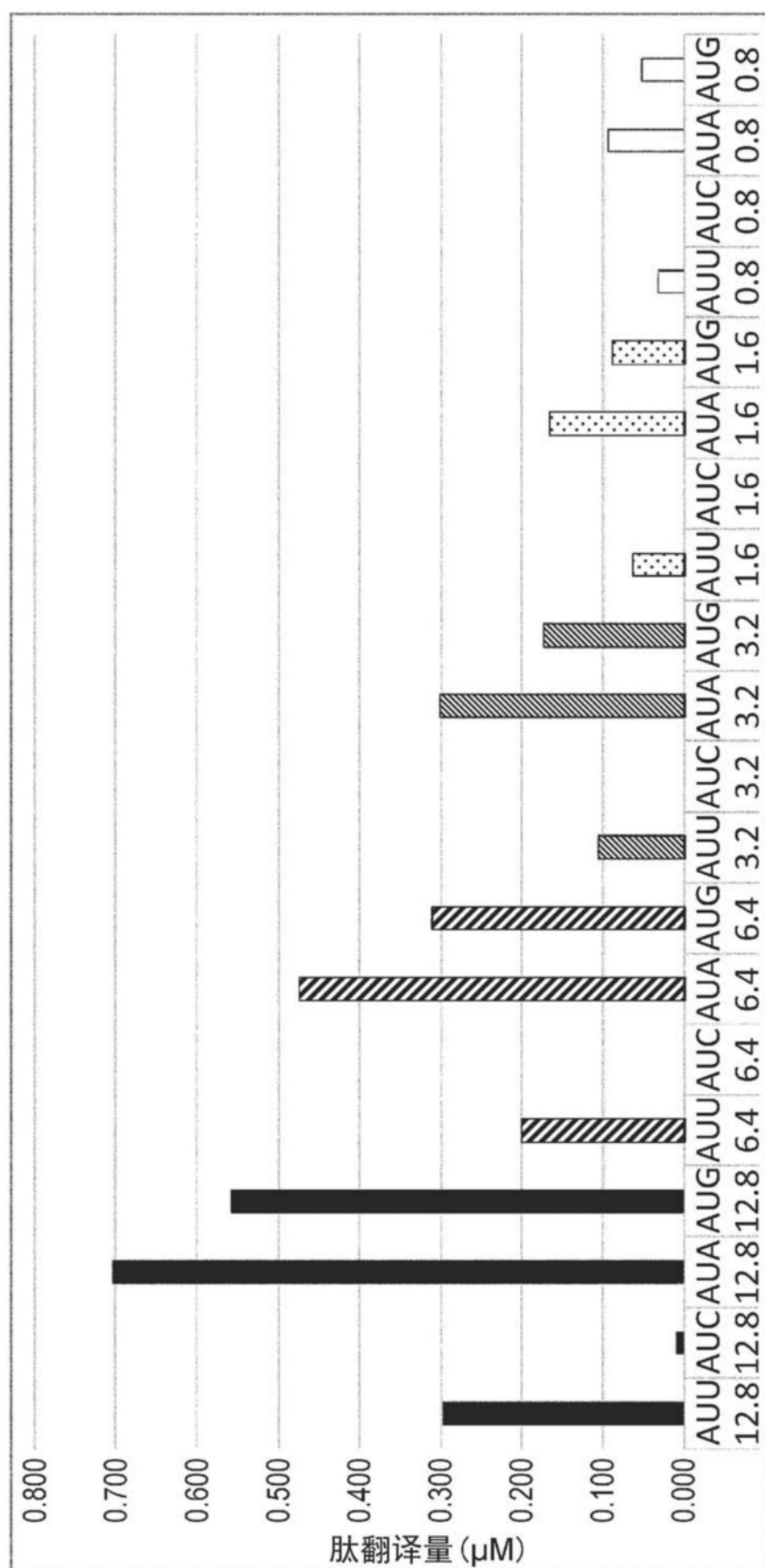


图26-1

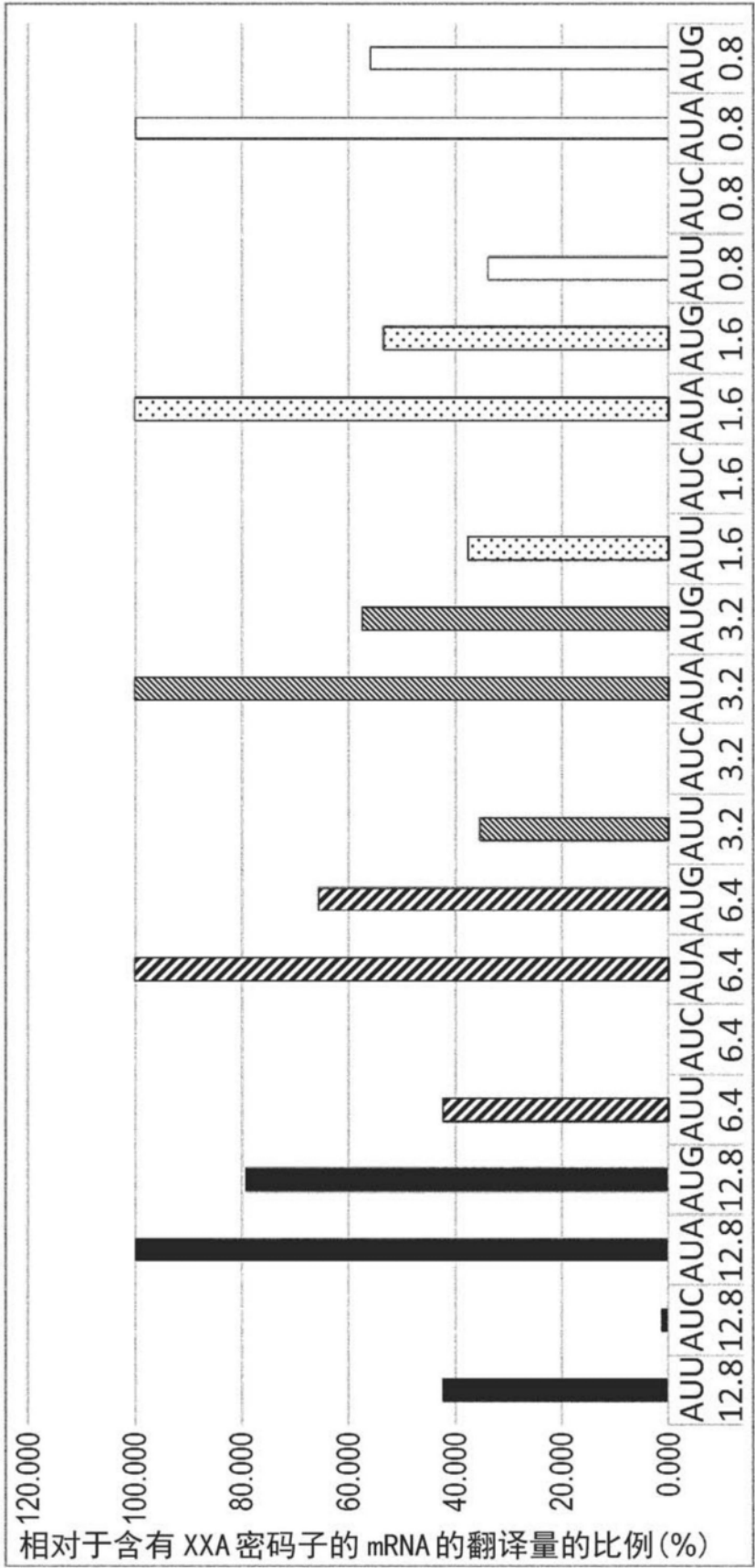


图26-2

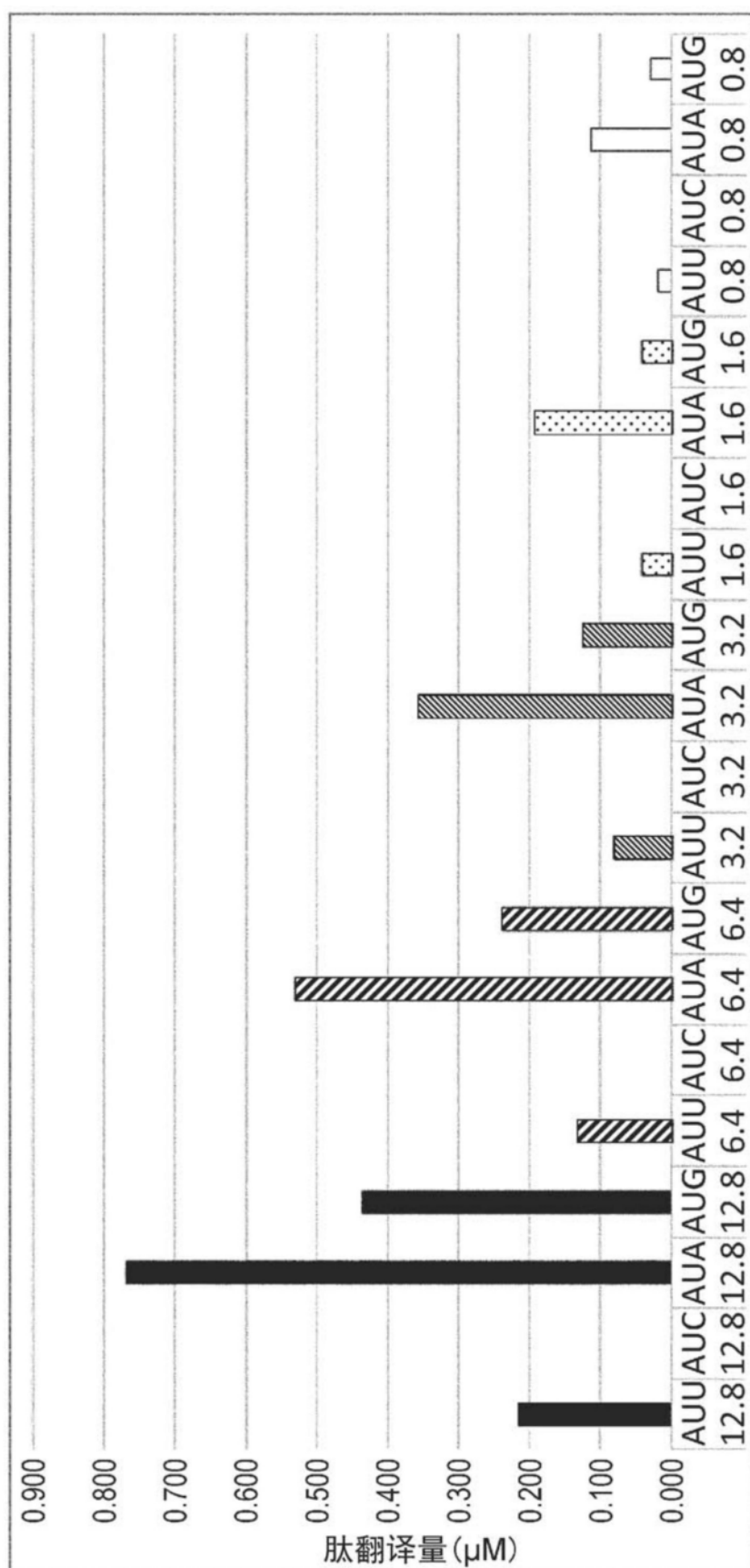


图27-1

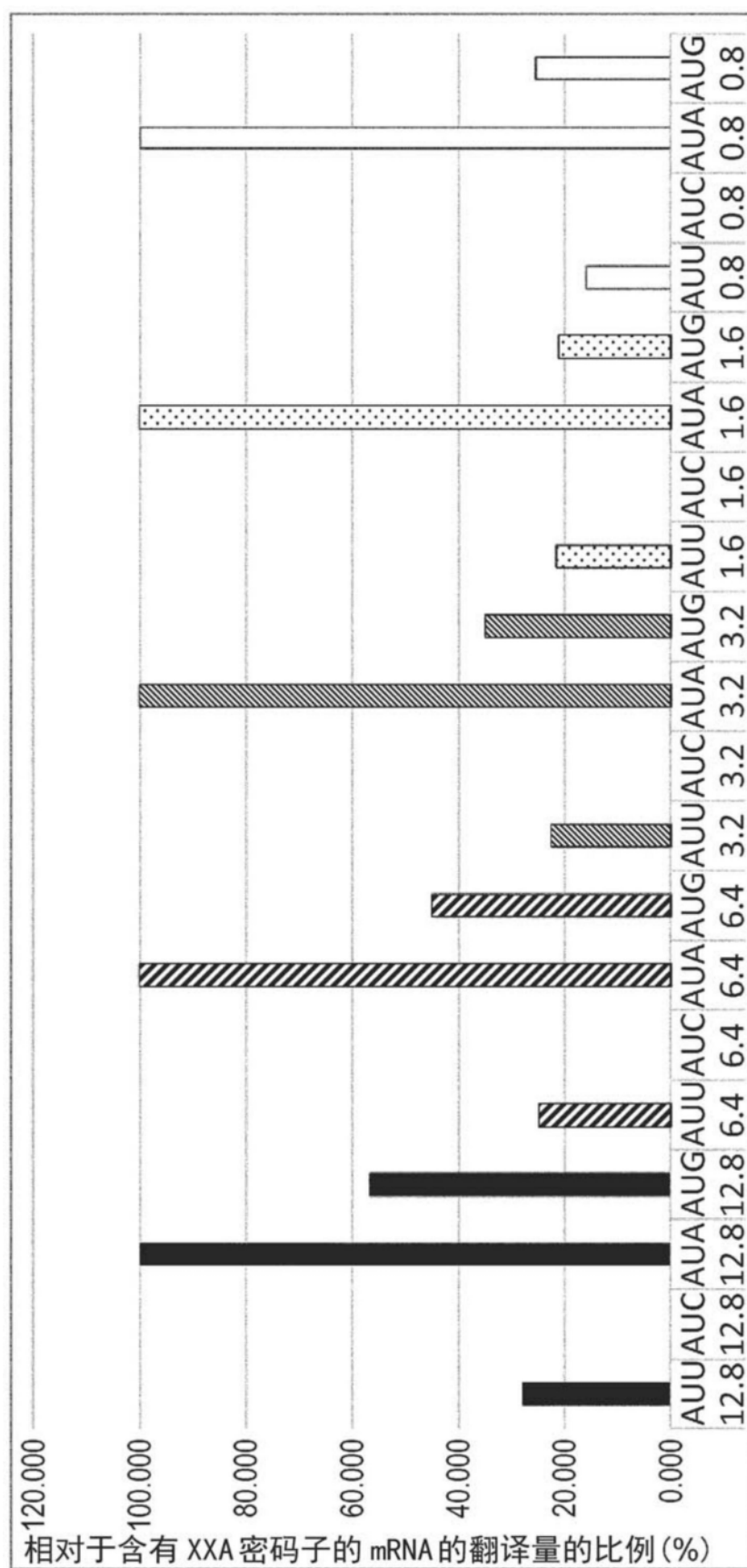


图27-2

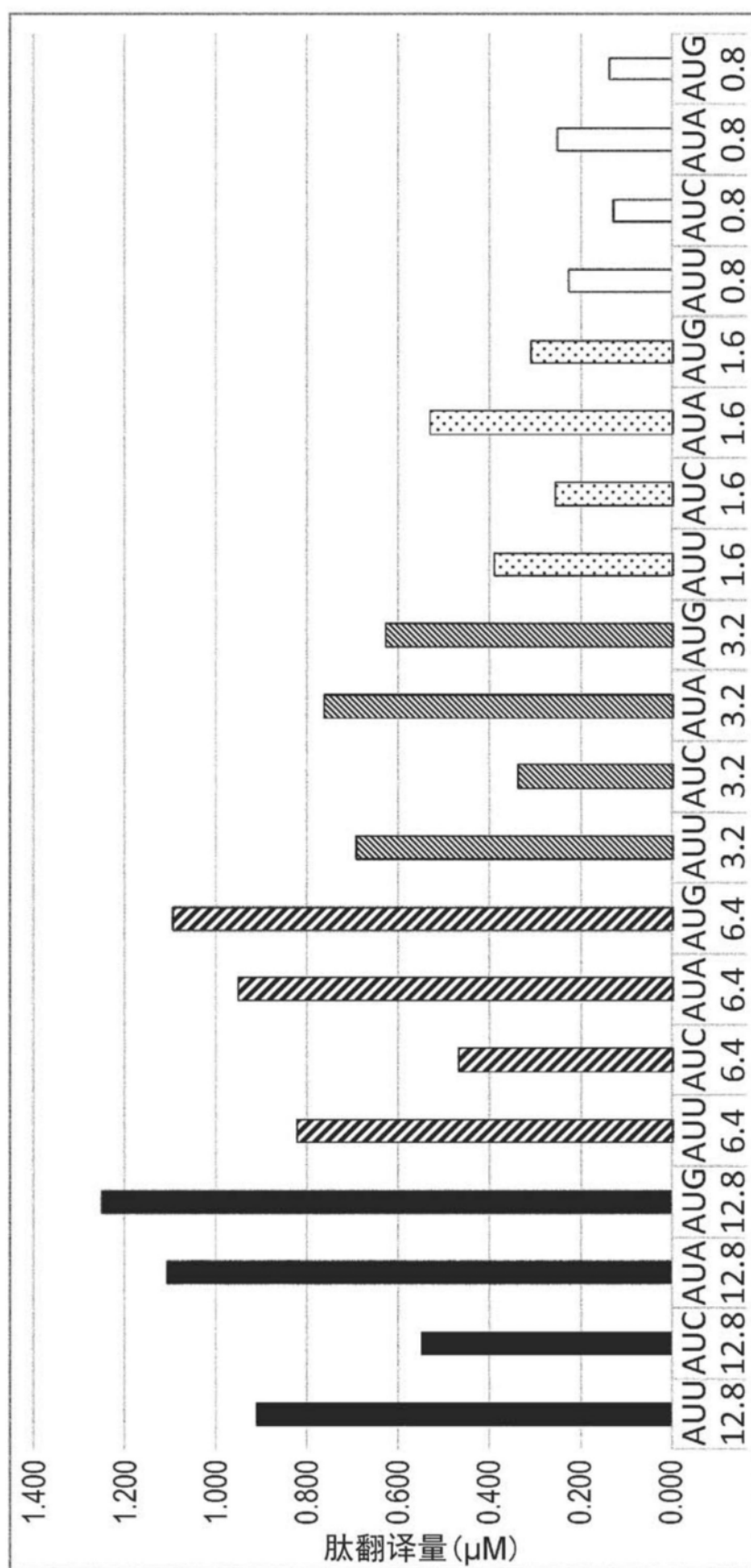


图28-1

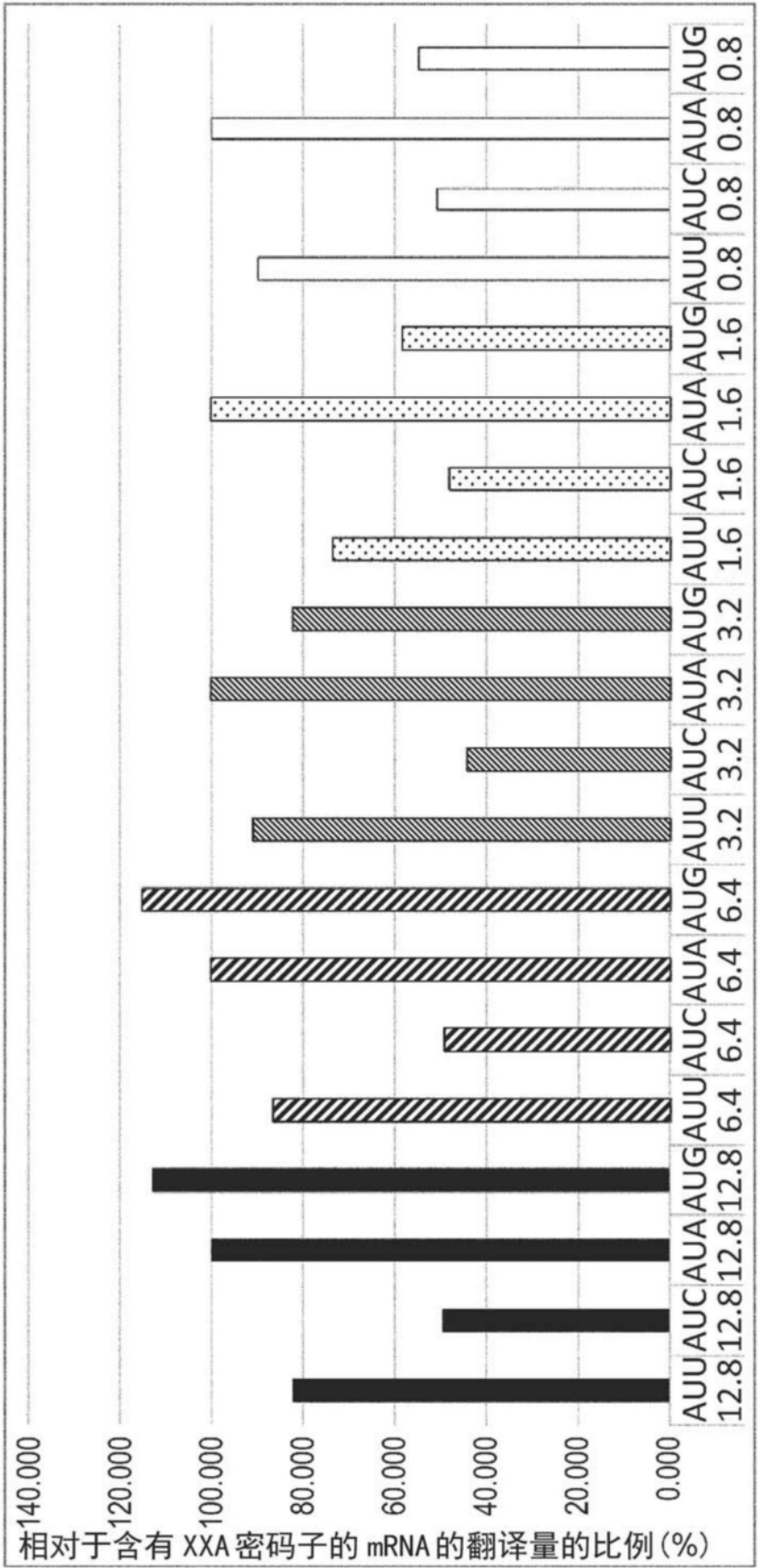


图28-2