(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114641569 A
(43)申请公布日 2022.06.17

(21)申请号 202080076538.4

(22)申请日 2020.12.25

(30)优先权数据
PCT/JP2019/051241 2019.12.26 JP
2020-109292 2020.06.25 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/048652 2020.12.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/132546 JA 2021.07.01

(71)申请人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都

(72)发明人 笼谷万奈 山下博子

(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 柴云峰 张莹

(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)

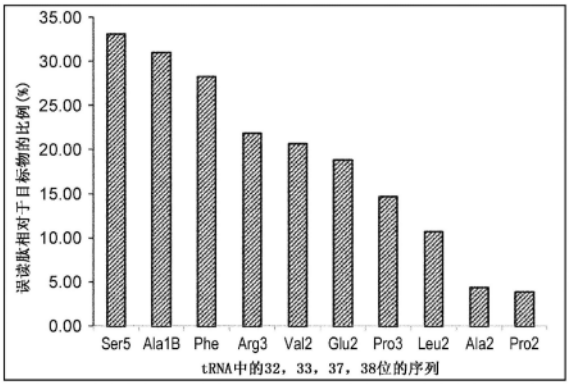
权利要求书2页 说明书130页
序列表54页 附图17页

(54)发明名称

翻译用组合物及肽的制备方法

(57)摘要

本公开的课题之一为提供能够降低密码子误读引起的误译为非预期氨基酸的比例的新手段。在一些实施方式中，本公开提供翻译用组合物，所述翻译用组合物包含在tRNA的32，33，37及38位(tRNA编号规则)具有特定碱基组合的tRNA。根据本公开特定的实施方式，能够降低密码子误读引起的非预期氨基酸被导入的比例。



CN 114641569 A

1.翻译用组合物,其包含结合第一氨基酸的第一tRNA和结合第二氨基酸的第二tRNA,

所述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)碱基的组合为

(1)32U,33U,37G,38A,

(2)32A,33U,37G,38U,

(3)32A,33U,37A,38U,

(4)32U,33U,37G,38U,

(5)32U,33U,37A,38U,或

(6)32C,33U,37G,38A,

所述第一tRNA和所述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基彼此不同,

所述第一tRNA和所述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基相同,

所述第一tRNA和所述第二tRNA的反密码子的第三个字母的碱基相同,

选自所述第一氨基酸及所述第二氨基酸中的至少一个为非天然氨基酸,

其中A为腺嘌呤,C为胞嘧啶,G为鸟嘌呤,U为尿嘧啶。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中,

所述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A或G而所述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C或U,或

所述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C或U而所述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A或G。

3.根据权利要求1或2所述的组合物,其中,

所述第一及所述第二tRNA的反密码子的第二个字母及第三个字母的碱基的组合为

(i)第二个字母为G,且第三个字母为G,

(ii)第二个字母为A,且第三个字母为G,

(iii)第二个字母为C,且第三个字母为C,

(iv)第二个字母为G,且第三个字母为C,

(v)第二个字母为A,且第三个字母为C,

(vi)第二个字母为G,且第三个字母为U,

(vii)第二个字母为G,且第三个字母为A,或

(viii)第二个字母为C,且第三个字母为G。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的组合物,其中所述第一tRNA的tRNA体为嵌合tRNA体。

5.根据权利要求1～4中任一项所述的组合物,其为用于无细胞翻译的组合物。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的组合物,其中所述嵌合tRNA体为32,33,37及38位(tRNA编号规则)碱基与除这些以外部位的碱基序列的来源不同的嵌合tRNA体。

7.根据权利要求1～6中任一项所述的组合物,其中所述第一tRNA为人工tRNA。

8.根据权利要求1～7中任一项所述的组合物(但是,不包括下述组合物:所述第一tRNA及所述第二tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有权利要求1的(4)中限定的碱基,并具有在1～31位及39～74位(tRNA编号规则)具有含有SEQ ID No:255所述碱基序列的tRNA中1～31位及39～74位(tRNA编号规则)碱基序列的嵌合tRNA体的情况下,所述第一tRNA及所述第二tRNA的反密码子组合为GCG及CCG的组合物以及为CCG及GCG的组合物)。

9.根据权利要求1～8中任一项所述的组合物,其中所述第一tRNA为具有嵌合反密码子环的tRNA。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的组合物,其中所述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)碱基的组合为

(1)32U,33U,37G,38A,

(2)32A,33U,37G,38U,

(3)32A,33U,37A,38U,或

(4)32U,33U,37G,38U。

11.根据权利要求1～10中任一项所述的组合物,其中所述第二氨基酸为非天然氨基酸。

12.权利要求1～11中任一项所述的组合物的制备方法,其包括通过将所述第一氨基酸在翻译体系外与tRNA结合而制备所述第一tRNA的工序,和/或通过将所述第二氨基酸在翻译体系外与tRNA结合而制备所述第二tRNA的工序。

13.肽的制备方法,其包括使用权利要求1～11中任一项所述的组合物翻译核酸。

14.降低密码子误读的方法,所述方法包括使用权利要求1～11中任一项所述的组合物翻译核酸,所述密码子误读为所述第一tRNA引起的与所述第二tRNA的反密码子互补的密码子的误读。

15.降低密码子误读的方法,所述方法包括取代选自由具有与第一密码子互补的反密码子的tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)组成的组中的至少1个碱基,所述密码子误读为所述tRNA引起的第二密码子的误读,其中,

所述第一密码子与所述第二密码子的第一个字母为相同的碱基,

所述第一密码子与所述第二密码子的第二个字母为相同的碱基,

所述第一密码子与所述第二密码子的第三个字母为彼此不同的碱基。

翻译用组合物及肽的制备方法

技术领域

[0001] 本公开涉及翻译用组合物及肽的制备方法。

背景技术

[0002] 无细胞翻译体系(非专利文献1)被利用于从阐明生命现象到新药开发的范围广泛的领域中,所述无细胞翻译体系通过仅将参与蛋白质翻译的因子混合在一起而人工重建而成。由于不使用微生物、细胞,因此无细胞翻译体系可以用于合成毒性高的蛋白质。另外,由于可以根据目的而去除或添加氨基酸,tRNA,氨酰tRNA合成酶等构成成分,因此,也可以改变密码子与氨基酸的对应关系(遗传密码的重编程)。由于这些特征,无细胞翻译体系也应用在合成含有非天然氨基酸的蛋白质、构建导入多种构成要素(building block)的展示文库中。这样的无细胞翻译体系是非常有用的技术,但由于密码子的误读,有时产生非预期的肽。有报告当例如使RF1失活,给琥珀密码子(UAG)分配了非天然氨基酸时,对于该密码子错误地以一定的比例导入了酪氨酸(UAU,UAC),赖氨酸(AAG),谷氨酰胺(GAG)(非专利文献2)。

[0003] 有报道将密码子盒进行人工分割,进行遗传密码的重编程的例子。在非专利文献3中,尝试了将C-G-C/G,G-U-C/G及G-G-C/G分配给1个非天然氨基酸和1个天然氨基酸。在该文献中,作为降低由与Gly发生结合的$tRNA^{Gly}_{CCC}$引起的GGC密码子的误读的方案,记载了在具有与GGC互补的反密码子GCC并且预加载了氨基酸的tRNA竭尽前将翻译反应中止,但没有记载怎样的翻译用组合物能够降低密码子的误读。另外,虽然在非专利文献4～7,专利文献1及2中也尝试人工分割密码子盒,但没有关于降低密码子误读的方法的记载。

[0004] 已知在位于tRNA的反密码子环的32及38位中,每个反密码子的三联体中有一个特定碱基是保守的。基于使用具有反密码子GGC的$tRNA(Ala)_{GGC}$的报告显示,当在32及38位使用在天然的$tRNA(Ala)_{GGC}$中保守的碱基的情况下,不易发生GUC密码子的误读,另一方面,在改变32及38位的碱基的情况下,产生由该tRNA引起的GUC密码子的误读,错误地翻译导入丙氨酸(GCC)(非专利文献8)。该文献停留在证实使用天然的遗传密码表由$tRNA(Ala)_{GGC}$引起的GUC密码子的误读,关于重编程遗传密码表时可能产生的密码子的误读没有记载。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:WO2019/139126

[0008] 专利文献2:WO2012/026566

[0009] 非专利文献

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

[0011] 非专利文献2:Gan et al.,Biochem.Biophys.Acta,2017 Dec;1861;3047-3052.

[0012] 非专利文献3:Iwane et al.,Method Mol.Biol.,2018,1728,17-47.

[0013] 非专利文献4:Passioura et al.,J Am.Chem.Soc.,2018,140,11551-11555.

[0014] 非专利文献5:Passioura et al.,Cell Chem.Biol.,2018,25,906-915.

[0015] 非专利文献6:Iwane et al.,Nat.Chem.,2016,8,317-325.

[0016] 非专利文献7:Azusa et al.,Peptide Science 2009,2010 Mar;17-18.

[0017] 非专利文献8:Murakami et al.,Nat.Struct.Mol.Biol.,2009 Mar;16;353-358.

发明内容

[0018] 发明所要解决的问题

[0019] 本发明是鉴于这种情况作出的,本发明的目标之一为提供翻译用组合物,及使用该翻译用组合物的肽的制备方法,所述翻译用组合物能够降低基于tRNA密码子的误读引起的非预期氨基酸的误译比例。

[0020] 用于解决问题的手段

[0021] 本发明人发现,通过为翻译中使用的tRNA的反密码子环选择特定的碱基可以解决上述课题。本发明是基于这样的见解作出的,具体而言包括以下例示性记载的实施方式。

[0022] [1]翻译用组合物,其包含结合第一氨基酸的第一tRNA和结合第二氨基酸的第二tRNA,

[0023] 上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0024] (1)32U,33U,37G,38A,

[0025] (2)32A,33U,37G,38U,

[0026] (3)32A,33U,37A,38U,

[0027] (4)32U,33U,37G,38U,

[0028] (5)32U,33U,37A,38U,或

[0029] (6)32C,33U,37G,38A,

[0030] 上述第一tRNA和上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基彼此不同,

[0031] 上述第一tRNA和上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基相同,

[0032] 上述第一tRNA和上述第二tRNA的反密码子的第三个字母的碱基相同,

[0033] 上述第一氨基酸及上述第二氨基酸中的至少一个为非天然氨基酸,

[0034] 其中A为腺嘌呤,C为胞嘧啶,G为鸟嘌呤,U为尿嘧啶。

[0035] [2]根据[1]所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子为$N_{11}N_{12}N_{13}$(其中N_{11},N_{12},及N_{13}互相独立地为A,C,G或U)。

[0036] [3]根据[1]或[2]所述的组合物,其中上述第二tRNA的反密码子为$N_{21}N_{22}N_{23}$(其中N_{21},N_{22},及N_{23}互相独立地为A,C,G或U)。

[0037] [4]根据[1]～[3]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的tRNA体为嵌合tRNA体。

[0038] [5]根据[1]～[4]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A或G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C或U,或

[0039] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C或U而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A或G。

[0040] [6]根据[1]～[5]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A或G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C或U。

[0041] [7]根据[1]～[6]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或

[0042] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A,或

[0043] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或

[0044] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G,或

[0045] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0046] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A,或

[0047] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0048] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G。

[0049] [8]根据[1]～[7]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或

[0050] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A,或

[0051] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0052] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A,或

[0053] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0054] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G。

[0055] [9]根据[1]～[7]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或

[0056] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A,或

[0057] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0058] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0059] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C。

[0060] [10]根据[1]～[7]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或

[0061] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的

第一个字母的碱基为A,或

[0062] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或,

[0063] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G。

[0064] [11]根据[1]～[10]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或

[0065] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A。

[0066] [12]根据[1]～[7]及[10]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C,或,

[0067] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G。

[0068] [13]根据[1]～[8]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0069] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A。

[0070] [14]根据[1]～[8]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U,或

[0071] 上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为U而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为G。

[0072] [15]根据[1]～[11]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A而上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C。

[0073] [16]根据[1]～[15]中任一项所述的组合物,其中上述第一及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母及第三个字母的碱基的组合为

[0074] (i)第二个字母为G,且第三个字母为G,

[0075] (ii)第二个字母为A,且第三个字母为G,

[0076] (iii)第二个字母为C,且第三个字母为C,

[0077] (iv)第二个字母为G,且第三个字母为C,

[0078] (v)第二个字母为A,且第三个字母为C,

[0079] (vi)第二个字母为G,且第三个字母为U,

[0080] (vii)第二个字母为G,且第三个字母为A,或

[0081] (viii)第二个字母为C,且第三个字母为G。

[0082] [17]根据[1]～[16]中任一项所述的组合物,其中上述第一及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母及第三个字母的碱基的组合为

[0083] (i)第二个字母为G,且第三个字母为G,

[0084] (ii)第二个字母为A,且第三个字母为G,

[0085] (iii)第二个字母为C,且第三个字母为C,

[0086] (iv)第二个字母为G,且第三个字母为C,

[0087] (v)第二个字母为A,且第三个字母为C,

[0088] (vi)第二个字母为G,且第三个字母为U,或

[0089] (vii)第二个字母为G,且第三个字母为A。

[0090] [18]根据[1]～[17]中任一项所述的组合物,其中上述第一及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母及第三个字母的碱基的组合为

[0091] (i)第二个字母为G,且第三个字母为G,

[0092] (ii)第二个字母为A,且第三个字母为G,或

[0093] (iii)第二个字母为C,且第三个字母为C。

[0094] [19]根据[1]～[18]中任一项所述的组合物,其中上述第一及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基为G,且第三个字母的碱基为G。

[0095] [20]根据[1]～[18]中任一项所述的组合物,其中上述第一及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基为A,且第三个字母的碱基为G。

[0096] [21]根据[1]～[18]中任一项所述的组合物,其中上述第一及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基为C,且第三个字母的碱基为C。

[0097] [22]根据[1]～[21]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列不源自具有选自由SEQ ID No:275,294,295,296,302,303,及304组成的组中的至少1个碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列中的任一种。

[0098] [23]根据[1]～[22]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列源自具有选自由(a)SEQ ID No:253,(b)SEQ ID No:255,及(c)SEQ ID No:254组成的组中的至少1个碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列。

[0099] [24]根据[1]～[23]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列为具有选自由(a)SEQ ID No:253,(b)SEQ ID No:255,及(c)SEQ ID No:254组成的组中的至少1个所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列。

[0100] [25]根据[1]～[24]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列与具有[24]的(a)～(c)中任一项所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列具有80％以上、优选为90％以上、更优选为95％以上的序列同一性。

[0101] [26]根据[1]～[25]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列不源自具有选自由SEQ ID No:275,294,295,296,302,303,及304组成的组中的至少1个碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列中的任一种。

[0102] [27]根据[1]～[26]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列源自具有选自由(a)SEQ ID No:253,(b)SEQ ID No:255,及(c)SEQ ID No:254组成的组中的至少1个碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列。

[0103] [28]根据[1]～[27]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的1～31位及39～

74位(tRNA编号规则)的碱基序列为具有选自由(a)SEQ ID No:253,(b)SEQ ID No:255,及(c)SEQ ID No:254组成的组中的至少1个碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列。

[0104] [29]根据[1]～[28]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列与具有[28]的(a)～(c)中任一项所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列具有80%以上、优选为90%以上、更优选为95%以上的序列同一性。

[0105] [30]根据[1]～[29]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA和上述第二tRNA的1～31位,及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列是相同的,或具有80%以上、优选为90%以上、更优选为95%以上的序列同一性。

[0106] [31]根据[1]～[30]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA和上述第二tRNA的1～31位,及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列相同。

[0107] [32]根据[4]～[31]中任一项所述的组合物,其中上述嵌合tRNA体的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合与所述嵌合tRNA体的除了所述组合以外的部位的碱基序列的来源不同。

[0108] [33]根据[1]～[32]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32～38位(tRNA编号规则)的碱基序列与大肠杆菌的野生型tRNA的32～38位(tRNA编号规则)的碱基序列不同。

[0109] [34]根据[1]～[33]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA为具有嵌合反密码子环的tRNA。

[0110] [35]根据[1]～[34]中任一项所述的组合物,其中上述第二氨基酸为非天然氨基酸。

[0111] [36]根据[1]～[35]中任一项所述的组合物,其中上述第一氨基酸为非天然氨基酸。

[0112] [37]根据[1]～[36]中任一项所述的组合物,其中上述第一氨基酸或上述第二氨基酸中的任一或两者为N取代氨基酸。

[0113] [38]根据[1]～[37]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA为人工tRNA。

[0114] [39]根据[1]～[38]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA为人工tRNA。

[0115] [40]根据[1]～[39]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的75,76位(tRNA编号规则)的碱基序列为CA。

[0116] [41]根据[1]～[40]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的75,76位(tRNA编号规则)的碱基序列为CA。

[0117] [42]根据[1]～[41]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA为不具有修饰碱基的tRNA。

[0118] [43]根据[1]～[42]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA为不具有修饰碱基的tRNA。

[0119] [44]根据[1]～[43]中任一项所述的组合物,其中上述第一氨基酸与上述第一tRNA的3′末端结合。

[0120] [45]根据[1]～[44]中任一项所述的组合物,其中上述第二氨基酸与上述第二

tRNA的3′末端结合。

[0121] [46]根据[1]～[45]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA为具有由A,U,G及C组成的碱基序列的tRNA。

[0122] [47]根据[1]～[46]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA为具有由A,U,G及C组成的碱基序列的tRNA。

[0123] [48]根据[1]～[47]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA为在翻译体系外结合有氨基酸的tRNA。

[0124] [49]根据[1]～[48]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA为在翻译体系外结合有氨基酸的tRNA。

[0125] [50]根据[1]～[49]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA及上述第二tRNA为源自大肠杆菌的tRNA。

[0126] [51]根据[1]～[50]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0127] (1)32U,33U,37G,38A,

[0128] (2)32A,33U,37G,38U,

[0129] (3)32A,33U,37A,38U,或

[0130] (4)32U,33U,37G,38U。

[0131] [52]根据[1]～[51]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0132] (1)32U,33U,37G,38A,

[0133] (2)32A,33U,37G,38U,或

[0134] (3)32A,33U,37A,38U。

[0135] [53]根据[1]～[52]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0136] (1)32U,33U,37G,38A,

[0137] (3)32A,33U,37A,38U,或

[0138] (4)32U,33U,37G,38U。

[0139] [54]根据[1]～[53]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为32U,33U,37G,38A,或32U,33U,37G,38U。

[0140] [55]根据[1]～[54]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为32U,33U,37G,38A。

[0141] [56]根据[1]～[52]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为32A,33U,37G,38U。

[0142] [57]根据[1]～[53]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为32A,33U,37A,38U。

[0143] [58]根据[1]～[51]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为32U,33U,37G,38U。

[0144] [59]根据[1]～[50]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为32U,33U,37A,38U。

[0145] [60]根据[1]～[50]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为32C,33U,37G,38A。

[0146] [61]根据[1]～[60]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0147] (1)32U,33U,37G,38A,

[0148] (2)32A,33U,37G,38U,

[0149] (3)32A,33U,37A,38U,

[0150] (4)32U,33U,37G,38U,

[0151] (5)32U,33U,37A,38U,或

[0152] (6)32C,33U,37G,38A。

[0153] [62]根据[1]～[61]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0154] (1)32U,33U,37G,38A,

[0155] (2)32A,33U,37G,38U,

[0156] (3)32A,33U,37A,38U,或

[0157] (4)32U,33U,37G,38U。

[0158] [63]根据[1]～[62]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA的tRNA体为嵌合tRNA体。

[0159] [64]根据[1]～[63]中任一项所述的组合物,其为用于无细胞翻译的组合物。

[0160] [65]根据[1]～[64]中任一项所述的组合物,其为重建的用于无细胞翻译的组合物。

[0161] [66]根据[1]～[65]中任一项所述的组合物,其为用源自大肠杆菌的因子重建的用于无细胞翻译的组合物。

[0162] [67]根据[1]～[66]中任一项所述的组合物,其包含源自大肠杆菌的核糖体。

[0163] [68]根据[1]～[67]中任一项所述的组合物,其包含具有与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子的mRNA。

[0164] [69]根据[1]～[68]中任一项所述的组合物,其包含具有与上述第一tRNA的反密码子互补的密码子及与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子的mRNA,任选地,与上述第一tRNA的反密码子互补的密码子及与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子可以包含在同一mRNA中,或包含在不同mRNA中。

[0165] [70]根据[1]～[69]中任一项所述的组合物,其不包含使上述第一tRNA或上述第二tRNA能与氨基酸结合的aaRS(amino acyl-tRNA synthetase)。

[0166] [71]根据[1]～[70]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA及上述第二tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有含有上述[1](4)中限定的碱基的组合,并具有嵌合tRNA体,所述嵌合tRNA体在1～31位及39～74位(tRNA编号规则)具有含有SEQ ID No:255所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列的情况下,上述第一tRNA及上述第二tRNA的反密码子的组合为GCG及CCG的组合物,以及为CCG及GCG的组合物)。

[0167] [72]根据[1]～[71]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第

一tRNA及上述第二tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有含有上述[1](4)中限定的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下,上述第一tRNA及上述第二tRNA的反密码子的组合为GCG及CCG的组合物,以及为CCG及GCG的组合物)。

[0168] [73]根据[1]～[72]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA及上述第二tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有含有上述[1](4)中限定的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下,上述第一tRNA及上述第二tRNA的反密码子的组合为AAG及UAG的组合物,为AAG及CAG的组合物,以及为UAG及CAG的组合物)。

[0169] [74]根据[1]～[73]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA及上述第二tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有含有上述[1](4)中限定的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下,上述第一tRNA及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基均为C,第三个字母的碱均为G的组合物)。

[0170] [75]根据[1]～[74]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA及上述第二tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有含有上述[1](4)中限定的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下,上述第一tRNA及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基均为A,第三个字母的碱均为G的组合物)。

[0171] [76]根据[1]～[75]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA及上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基均为C,第三个字母的碱均为G的组合物)。

[0172] [77]根据[1]～[76]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有上述[1](4)中限定的碱基的组合的情况下,上述第一tRNA反密码子的第二个字母的碱基为A,第三个字母的碱基为G的组合物)。

[0173] [78]根据[1]～[77]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有上述[1](1)中限定的碱基的组合的情况下,上述第一tRNA的反密码子为UGG及CGG的组合物)。

[0174] [79]根据[1]～[78]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有上述[1](2)中限定的碱基的组合的情况下,上述第一tRNA的反密码子为AGG及GGG的组合物)。

[0175] [80]根据[1]～[79]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有含有上述[1](6)中限定的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下,上述第一tRNA的反密码子为GCG及CCG的组合物)。

[0176] [81]根据[1]～[80]中任一项所述的组合物(其中,不包括下述组合物:在上述第一tRNA在32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有含有上述[1](3)中限定的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下,上述第一tRNA的反密码子为AGC及GGC的组合物)。

[0177] [82]根据[1]～[81]中任一项所述的组合物,其中上述第一tRNA及上述第二tRNA为延长tRNA。

[0178] [83]根据[37]～[82]中任一项所述的组合物,其中上述N取代氨基酸为N-甲基氨基酸。

[0179] [84]根据[1]～[83]中任一项所述的组合物,其中上述氨基酸为可翻译的氨基酸。

[0180] [85]根据[1]～[84]中任一项所述的组合物,其中上述第二tRNA为具有嵌合反密

码子环的tRNA。

[0181] [86][1]～[85]中任一项所述的翻译用组合物的制备方法，包含通过将上述第一氨基酸在翻译体系外与tRNA结合而制备上述第一tRNA的工序，和/或通过将上述第二氨基酸在翻译体系外与tRNA结合而制备上述第二tRNA的工序。

[0182] [87]根据[86]所述的方法，其通过选自由制备上述第一tRNA，和/或上述第二tRNA的工序，pCpA法，pdCpA法，用Flexizyme的方法，及用aaRS的方法组成的组中的至少一个方法进行。

[0183] [88]根据[86]或[87]所述的方法，其包括通过体外转录制备上述第一tRNA的工序。

[0184] [89]根据[86]～[88]中任一项所述的方法，其包括通过体外转录制备上述第二tRNA的工序。

[0185] [A1]肽的制备方法，其包括使用[1]～[85]中任一项所述的翻译用组合物或根据[86]～[89]中任一项所述的方法制备的翻译用组合物翻译核酸。

[0186] [A2]包括使用[1]～[85]中任一项所述的翻译用组合物或根据[86]～[89]中任一项所述的方法制备的翻译用组合物翻译核酸，降低由上述第一tRNA引起的，与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子的误读的方法。

[0187] [A3]根据[A1]或[A2]所述的方法，其中上述核酸为具有与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子的mRNA。

[0188] [A4]根据[A3]所述的方法，其中上述核酸为具有与上述第一tRNA的反密码子互补的密码子的mRNA，任选地，与上述第一tRNA的反密码子互补的密码子及与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子可以包含在同一mRNA中，也可以包含在不同mRNA中。

[0189] [A5]根据[A1]～[A4]中任一项所述的方法，其包括翻译包含上述核酸的核酸文库而得到肽文库。

[0190] [A6]根据[A1]～[A5]中任一项所述的方法，其中与上述第一tRNA的反密码子互补的密码子为与该反密码子在3个碱基上全部形成沃森-克里克型碱基对的密码子。

[0191] [A7]根据[A1]～[A6]中任一项所述的方法，其中与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子为与该反密码子在3个碱基上全部形成沃森-克里克型碱基对的密码子。

[0192] [A8]根据[A1]～[A5]中任一项所述的方法，其中与上述第一tRNA的反密码子互补的密码子的第三个字母与该反密码子的第一个字母形成摆动碱基对。

[0193] [A9]根据[A1r-[A6]或[A8]中任一项所述的方法，其中与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子的第三个字母与该反密码子的第一个字母形成摆动碱基对。

[0194] [A10]根据[A1]～[A9]中任一项所述的方法，其中上述核酸为mRNA。

[0195] [A11]根据[A1]～[A10]中任一项所述的方法制备的肽或肽文库。

[0196] [A12]使用[1]～[85]中任一项所述的翻译用组合物或根据[86]～[89]中任一项所述的方法制备的翻译用组合物制备的肽。

[0197] [A13]使用[1]～[85]中任一项所述的翻译用组合物或根据[86]～[89]中任一项所述的方法制备的翻译用组合物制备的肽文库。

[0198] [A14]与靶分子结合的肽的鉴定方法，其包括使用[A1]～[A10]中任一项所述的方法制备肽文库的工序，及使该肽文库接触该靶分子的工序。

[0199] [B1]包括将选自由具有与第一密码子互补的反密码子的tRNA的32,33,37及38位(tRNA编号规则)组成的组中的至少1个碱基取代,降低由上述tRNA引起的第二密码子的误读的方法,其中,

[0200] 上述第一密码子与上述第二密码子的第一个字母为相同的碱基,

[0201] 上述第一密码子与上述第二密码子的第二个字母为相同的碱基,

[0202] 上述第一密码子与上述第二密码子的第三个字母为彼此不同的碱基,上述方法。

[0203] [B2]根据[B1]所述的方法,其中上述取代后的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0204] (1)32U,33U,37G,38A,

[0205] (2)32A,33U,37G,38U,

[0206] (3)32A,33U,37A,38U,

[0207] (4)32U,33U,37G,38U,

[0208] (5)32U,33U,37A,38U,或

[0209] (6)32C,33U,37G,38A,

[0210] 其中A为腺嘌呤,C为胞嘧啶,G为鸟嘌呤,U为尿嘧啶。

[0211] [B3]根据[B1]或[B2]所述的方法,其包括将具有与上述第一密码子互补的反密码子的tRNA的选自由32,37及38位(tRNA编号规则)组成的组中的至少1个碱基取代。

[0212] [B4]根据[B1]～[B3]中任一项所述的方法,其中上述第一密码子为M_1M_2X,上述第二密码子为M_1M_2Y,

[0213] 上述M_1及上述M_2各自独立地为A,C,G或U,

[0214] 上述X及上述Y分别为选自A,C,G及U的彼此不同的碱基。

[0215] [B5]根据[B4]所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为选自下组的任一种:

[0216] (a1)U和G;(a2)G和U;(a3)U和A;(a4)A和U;(a5)C和A;(a6)A和C;(a7)C和G;及(a8)G和C。

[0217] [B6]根据[B4]或[B5]所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为选自下组的任一种:

[0218] (a1)U和G;(a2)G和U;(a3)U和A;(a5)C和A;及(a7)C和G。

[0219] [B7]根据[B5]所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为(a1)U和G,或(a2)G和U。

[0220] [B8]根据[B5]～[B7]中任一项所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为(a1)U和G。

[0221] [B9]根据[B5]～[B7]中任一项所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为(a2)G和U。

[0222] [B10]根据[B5]或[B6]所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为(a3)U和A。

[0223] [B11]根据[B5]或[B6]所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为(a5)C和A。

[0224] [B12]根据[B5]或[B6]所述的方法,其中上述X及上述Y的碱基的组合为(a7)C和G。

[0225] [B13]根据[B4]～[B12]中任一项所述的方法,其中上述M_1M_2为选自下组的任意碱基序列:

[0226] (b1)CC;(b2)CU;(b3)GG;(b4)GU;(b5)GC;(b6)UC;(b7)CG;及(b8)AC。

[0227] [B14][B13]所述的方法,其中上述M_1M_2为选自下组的任意碱基序列:

[0228] (b1)CC;(b2)CU;及(b3)GG。

[0229] [B15]根据[B13]或[B14]所述的方法,其中上述M_1M_2的碱基序列为(b1)CC。

[0230] [B16]根据[B13]或[B14]所述的方法,其中上述M_1M_2的碱基序列为(b2)CU。

[0231] [B17]根据[B13]或[B14]所述的方法,其中上述M_1M_2的碱基序列为(b3)GG。

[0232] [B18]根据[B1]～[B17]中任一项所述的方法,其中上述第一密码子与上述tRNA的反密码子在3个碱基上全部形成沃森-克里克型碱基对。

[0233] [B19]根据[B1]～[B17]中任一项所述的方法,其中上述第一密码子的第三个字母的碱基与上述tRNA的反密码子的第一个字母的碱基形成摆动碱基对。

[0234] [B20]根据[B1]～[B19]中任一项所述的方法,其中上述tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列源自具有选自由(a)SEQ ID No:253,(b)SEQ ID No:255,及(c)SEQ ID No:254组成的组中的至少1个所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列。

[0235] [B21][B1]～[B20]中任一项所述的方法,其中上述tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列为具有选自由(a)SEQ ID No:253,(b)SEQ ID No:255,及(c)SEQ ID No:254组成的组中的至少1个所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列。

[0236] [B22]根据[B1]～[B21]中任一项所述的方法,其中上述tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列与具有[B20]的(a)～(c)中任一项所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列具有80%以上、优选为90%以上、更优选为95%以上的序列同一性。

[0237] [B23]根据[B1]～[B22]中任一项所述的方法,其中包括氨基酸在翻译体系外与上述tRNA结合。

[0238] [B24]根据[B23]所述的方法,其中上述氨基酸在翻译体系外与tRNA结合通过选自由pCpA法,pdCpA法,用Flexizyme的方法,及用aaRS的方法组成的组中的至少一个方法进行。

[0239] [B25]根据[B23]或[B24]所述的方法,其中上述氨基酸为非天然氨基酸。

[0240] [B26]根据[B23]～[B25]中任一项所述的方法,其中上述非天然氨基酸为N取代氨基酸。

[0241] [B27]根据[B1]～[B26]中任一项所述的方法,进一步包括通过在体外的转录由模板核酸合成上述tRNA。

[0242] [B28]根据[B1]～[B27]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的37位(tRNA编号规则)的碱基为A。

[0243] [B29]根据[B1]～[B28]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的33位(tRNA编号规则)的碱基为U。

[0244] [B30]根据[B1]～[B29]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的32位(tRNA编号规则)的碱基为C或U。

[0245] [B31]根据[B1]～[B30]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的32位

(tRNA编号规则)的碱基为C。

[0246] [B32]根据[B1]～[B30]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的32位(tRNA编号规则)的碱基为U。

[0247] [B33]根据[B1]～[B32]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的38位(tRNA编号规则)的碱基为A或C。

[0248] [B34]根据[B1]～[B33]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的38位(tRNA编号规则)的碱基为A。

[0249] [B35]根据[B1]～[B33]中任一项所述的方法,其中上述tRNA在改变前的38位(tRNA编号规则)的碱基为C。

[0250] [B36]根据[B1]～[B35]中任一项所述的方法,其中上述取代后的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0251] (1)32U,33U,37G,38A,

[0252] (2)32A,33U,37G,38U,

[0253] (3)32A,33U,37A,38U,或

[0254] (4)32U,33U,37G,38U。

[0255] [B37]根据[B1]～[B36]中任一项所述的方法,其中上述取代后的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为

[0256] (1)32U,33U,37G,38A,

[0257] (2)32A,33U,37G,38U,或

[0258] (3)32A,33U,37A,38U。

[0259] [B38]根据[B1]～[B37]中任一项所述的方法(其中,不包括上述取代后的32,33,37及38位(tRNA编号规则)的碱基的组合为[B2](4)中指定的组合,在上述tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列为具有SEQ ID No:255所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位(tRNA编号规则)的碱基序列的情况下,上述第一密码子及上述第二密码子的组合为CGC及CGG的方法,以及为CGG及CGC的方法)。

[0260] [B39]根据[B1]～[B38]中任一项所述的方法,进一步包括在包含碱基被取代的tRNA的翻译体系中翻译核酸。

[0261] [B40]根据[B26]～[B39]中任一项所述的方法,其中上述N取代氨基酸为N-甲基氨基酸。

[0262] [B41]根据[B23]～[B40]中任一项所述的方法,其中上述氨基酸为可翻译的氨基酸。

[0263] 发明的效果

[0264] 本公开提供包含tRNA的翻译用组合物,所述tRNA在其32,33,37及38位(tRNA编号规则)具有特定的碱基,以及提供包括使用该tRNA翻译核酸的肽制备方法等。通过使用本公开的组合物及方法等,可以降低肽的合成中基于tRNA密码子的误读引起的非预期氨基酸的误译的比例。

附图说明

[0265] [图1]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子

CCG的误读的比例的图。图中值基于在作为反密码子具有cgg及agg的tRNA的共存下，翻译具有CCG的密码子mRNA的结果(具体翻译量参考表6)而成，从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0266] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:241)的肽的翻译量(μM)×100

[0267] [图2]示出由tRNA(Glu2)的32，33，37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CCU的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有agg及cgg的tRNA的共存下，翻译具有CCU的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表7)而成，从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0268] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:241)的肽的翻译量(μM)×100

[0269] [图3]示出由tRNA(Glu2)的32，33，37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有ccc及acc的tRNA的共存下，翻译具有GGG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表8)而成，从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0270] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243)的肽的翻译量(μM)×100

[0271] [图4]示出由tRNA(Glu2)的32，33，37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGU的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有acc及ccc的tRNA的共存下，翻译具有GGU的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表9)而成，从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0272] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243)的肽的翻译量(μM)×100

[0273] [图5]示出由tRNA(Glu2)的32，33，37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CUG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有cag及aag的tRNA的共存下，翻译具有CUG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表10)而成，从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0274] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239)的肽的翻译量(μM)×100

[0275] [图6]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CUU的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有aag及cag的tRNA的共存下,翻译具有CUU的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表11)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0276] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239)的肽的翻译量(μM)×100

[0277] [图7]示出由tRNA(AsnE2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CUG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有cag及aag的tRNA的共存下,翻译具有CUG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表12)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0278] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239)的肽的翻译量(μM)×100

[0279] [图8]示出由tRNA(AsnE2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CUU的误读的比例的图。图中值为基于在为作为反密码子具有aag及cag的tRNA的共存下,翻译具有CUU的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表13)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0280] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239)的肽的翻译量(μM)×100

[0281] [图9]示出由tRNA(Asp1)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CUG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有cag及aag的tRNA的共存下,翻译具有CUG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表14)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0282] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239)的肽的翻译量(μM)×100

[0283] [图10]示出由tRNA(Asp1)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CUU的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有aag及cag的tRNA的共存下,翻译具有CUU的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表15)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0284] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239)的肽的翻译量(μM)

×100

[0285] [图11]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGA的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有ucc及acc的tRNA的共存下,翻译具有GGA的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表16)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0286] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243)的肽的翻译量(μM)×100

[0287] [图12]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGA的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有ucc及gcc的tRNA的共存下,翻译具有GGA的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表17)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0288] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243)的肽的翻译量(μM)×100

[0289] [图13]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有ccc及gcc的tRNA的共存下,翻译具有GGG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表18)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0290] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243)的肽的翻译量(μM)×100

[0291] [图14]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有acc及ccc的tRNA的共存下,翻译具有GGG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表21)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0292] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:245)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243)的肽的翻译量(μM)×100

[0293] [图15]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有acc及ccc的tRNA的共存下,翻译具有GGG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表22)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0294] 误读肽相对于目标物的比例(%)＝相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:246)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:

Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243)的肽的翻译量(μM)×100

[0295] [图16]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子GGG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有acc及ccc的tRNA的共存下,翻译具有GGG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表23)基于而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0296] 误读肽相对于目标物的比例(%)=相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:248)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:247)的肽的翻译量(μM)×100

[0297] [图17]

[0298] 示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CCG的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有cgg及agg的tRNA的共存下,翻译具有CCG的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表24)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0299] 误读肽相对于目标物的比例(%)=相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:249)的肽的翻译量(μM)×100

[0300] [图18]示出由tRNA(Glu2)的32,33,37及38位的碱基的组合的差异引起的密码子CCU的误读的比例的图。图中值为基于在作为反密码子具有agg及cgg的tRNA的共存下,翻译具有CCU的密码子的mRNA的结果(具体翻译量参考表25)而成,从以下所示数式算出了纵轴的误读肽相对于目标物的比例(%)。

[0301] 误读肽相对于目标物的比例(%)=相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242)的肽的翻译量(μM)/相当于序列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:249)的肽的翻译量(μM)×100

具体实施方式

[0302] 为了解释本说明书的目的,适用以下定义,在适用的情况下,以单数形式使用的术语中也包括复数形式,反之亦然。应该理解,本说明书使用的术语仅为了说明特定的实施方式,不意在进行限定。当下述定义中的任一种与通过参考而并入本说明书的任意文件矛盾的情况下,以下述的定义优先。

[0303] “密码子”是指活体内的遗传信息翻译成蛋白质时的对应各氨基酸的3个碱基的组合(三联体)。DNA的情况可以使用腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G),胞嘧啶(C),及胸腺嘧啶(T)4种碱基,mRNA的情况可以使用腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G),胞嘧啶(C),及尿嘧啶(U)4种碱基。示出各密码子和氨基酸的对应关系的表称作遗传密码表或者密码子表,20种氨基酸分配在不包括终止密码子的61种密码子中(表1)。表1中记载的遗传密码表在真核生物及原核生物(真细菌及古细菌)中几乎全部的生物中共通使用,因此,也称为标准遗传密码表或者普通遗传密码表。在本公开中将天然存在的生物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(改变了密码子和氨基酸的对应关系)的遗传密码表进行区别。在遗传密码表中,通常,第一个字母和第二个字母是共通的,仅第三个字母不同的4个密码子被归在一个盒中,将它们称为密码子盒。在本公开中,有时通过在密码子的第一个字母及第二个字母的碱基后排列表示选自A,C,G及U的任意碱基的"M"表示特定的密码子盒。例如,在天然的遗传密码表中,分配给Ser的,密码子的第一个字母为U,第二个字母为C的密码子盒被标为"UCM",分配给Pro的密码子盒被标为"CCM"。

[0304] [表1]

[0305]

	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

[0306] 在本公开中,mRNA中的密码子有时以"$M_1M_2M_3$"表示。其中M_1,M_2,及M_3分别表示密码子的第一个字母,第二个字母,及第三个字母的碱基。

[0307] "反密码子"是指与mRNA上的密码子相对应的tRNA上的3个连续的碱基。与mRNA同样,在反密码子中可以使用腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G),胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)4种碱基。进一步,有时也可以使用修饰它们而得到的修饰碱基。密码子被反密码子特异性识别,读取mRNA上的遗传信息,翻译成蛋白质。mRNA上的5′到3′方向的密码子序列与tRNA上的5′到3′方向的反密码子序列互补结合,因此,密码子的第一个字母,第二个字母,及第三个字母的碱基与反密码子的第三个字母,第二个字母,及第一个字母的碱基之间分别形成互补的碱基对。在本公开中,"修饰碱基"指所述碱基的碱基的结构的一部分与A,C,G及U为不同结构。

[0308] 在本公开中，第一tRNA中的反密码子有时以“$N_{11}N_{12}N_{13}$”表示，第二tRNA中的反密码子有时以“$N_{21}N_{22}N_{23}$”表示。其中，N_{11}，N_{12}及N_{13}，及N_{21}，N_{22}及N_{23}分别表示反密码子的第一个字母，第二个字母，及第三个字母的碱基。按照后述tRNA编号规则，N_{11}，N_{12}及N_{13}，以及N_{21}，N_{22}，及N_{23}分别被编号为tRNA的34位，35位，及36位。

[0309] 在本公开中，有时将碱基A，C，G，U，及T以小写字母表示，但大写字母和小写字母以相同意义使用。例如，GGG和ggg以相同意义使用。

[0310] 在本公开中，将热力学稳定的碱基对称为互相“互补”。除了腺嘌呤和尿嘧啶(A-U)，鸟嘌呤和胞嘧啶(G-C)等沃森-克里克型碱基对以外，基于鸟嘌呤和尿嘧啶(G-U)的非沃森-克里克型的摆动碱基对也包含在本公开的“互补”的碱基对中。特别地，认为由于密码子的第三个字母和反密码子的第一个字母之间存在空间的波动(摆动)，因此也允许如上所述的非沃森-克里克型碱基对的形成(摆动假说)。

[0311] 在本公开中，有时将密码子和反密码子的一定关系表述为“互补”。如密码子的第一个字母和反密码子的第三个字母，密码子的第二个字母和反密码子的第二个字母之间形成沃森-克里克型碱基对，密码子的第三个字母和反密码子的第一个字母之间形成沃森-克里克型或摆动碱基对这种密码子和反密码子的关系称为“互补”。例如，与密码子UCU互补的反密码子为AGA及GGA，与反密码子GCG互补的密码子为CGC及CGU。

[0312] “信使RNA(messenger RNA;mRNA)”是指带有可翻译成蛋白质的遗传信息的RNA。遗传信息以密码子形式编码在mRNA上，它们分别对应全部20种氨基酸。蛋白质的翻译从起始密码子开始，至终止密码子结束。真核生物的起始密码子原则上为AUG，在原核生物(真细菌及古细菌)中，除了AUG以外，GUG、UUG等也作为起始密码子使用。AUG为编码甲硫氨酸(Met)的密码子，在真核生物及古细菌中直接从甲硫氨酸开始翻译。另一方面，在真细菌中，起始密码子的AUG仅对应N-甲酰甲硫氨酸(fMet)，因此翻译从甲酰甲硫氨酸开始。终止密码子有UAA(赭石)，UAG(琥珀)，UGA(欧珀)3种。当称为翻译终止因子(release factor;RF)的蛋白质识别到终止密码子时，至此合成的肽链从tRNA解离，翻译工序结束。

[0313] “转运RNA(transfer RNA;tRNA)”是指介导以mRNA为模板的肽合成的100个碱基以下的短RNA。在二维结构上，转运RNA由3个茎环(D臂，反密码子臂，T臂)和1个茎(受体茎)组成，具有苜蓿叶状的结构。根据tRNA不同，有时进一步包含1个可变环。在反密码子臂中，存在由称为反密码子的3个连续的碱基组成的区域，反密码子通过与mRNA上的密码子形成碱基对而识别密码子。另一方面，在tRNA的3′末端存在由胞苷-胞苷-腺苷组成的核酸序列(CCA序列)，在其末端的腺苷残基上添加氨基酸(具体而言，腺苷残基的核糖的2位或3位的羟基与氨基酸的羧基进行酯键结合)。结合有氨基酸的tRNA称为“氨酰tRNA”。在本公开中，氨酰tRNA也包含在tRNA的定义中。另外，已知如后所述，从tRNA的CCA序列除去末端的2个残基(C及A)，将其用于氨酰tRNA的合成中的方法。去除这样的3′末端的CA序列的tRNA，也包含在本公开的tRNA的定义中。在活体内，向tRNA添加氨基酸利用称为氨酰tRNA合成酶(aminoacyl-tRNA synthetase;aaRS或ARS)的酶进行。通常，每个氨基酸存在1种氨酰tRNA合成酶，且各自的氨酰tRNA合成酶在多个tRNA的中，仅特异性识别特定的tRNA作为底物，tRNA与氨基酸的对应关系受到严密控制。

[0314] tRNA中的各碱基依照tRNA编号规则进行编号(Sprinzl et al.,Nucleic Acids Res(1998)26:148-153)。在本公开中，tRNA中碱基的编号遵循该编号规则。例如，反密码子

分别编号为34位～36位,3′末端的CCA序列分别编号为74～76位。

[0315] 在本公开中,为了表示tRNA的特定的位置的碱基,使用tRNA编号规则(Sprinzl et al.,Nucleic Acids Res(1998)26:148-153)和碱基的简称(A,C,G或U)。例如“32U”是指按照tRNA编号规则的32位的碱基为U(尿嘧啶)。另外,它们也用于表示tRNA的特定的位置的碱基的取代。例如“C32U”是指按照tRNA编号规则的32位的碱基的C(胞嘧啶)取代为U(尿嘧啶)。

[0316] “反密码子环”是指包含tRNA中32～38位的碱基,即反密码子的3个连续碱基,包含反密码子的5′侧及3′侧的2个碱基的7个连续碱基。反密码子环中可以使用腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G),胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)4种碱基。进一步,有时也可以使用修饰它们而得到的修饰碱基。

[0317] 本公开的“tRNA体(tRNA body)”是指除了反密码子(34～36位)以外的tRNA的主体部分(由核酸构成的主要结构部分)。一些实施方式中,本公开的tRNA体指tRNA的1～33位及37～76位。另外的实施方式中,本公开的tRNA体指tRNA的1～33位及37～74位。“嵌合tRNA体”是指tRNA体的一部分源自特定的供给源或种类的tRNA,另一方面,其余的部分源自不同的供给源或种类的tRNA的tRNA体。嵌合tRNA体中不包含仅源自1种类的tRNA的tRNA体。嵌合tRNA体为源自2种以上的tRNA的tRNA体即可,也可以源自3种以上的tRNA。作为本公开的嵌合tRNA体,可以为32,33,37及38位的碱基的组合与除其以外的部位的碱基序列的来源不同的嵌合tRNA体。作为嵌合tRNA体,可列举例如tRNA体的32,33,37及38位的碱基的组合源自tRNA Pro2,其余的部分的碱基序列源自tRNA Glu2的tRNA体。在本公开中,为了确定某tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合的来源,可参考源自大肠杆菌的tRNA的碱基序列(SEQ ID No:274～319)的32,33,37及38位的碱基的组合,确定为源自在32,33,37及38位具有相同碱基的组合的tRNA。例如,对32,33,37及38位的碱基的组合CUxxxAC,可通过参考SEQ ID No:274～319,确定为源自tRNA Glu2或tRNA Asp1。这种情况,对除了32,33,37及38位以外的部分的碱基序列为源自tRNA Glu2或tRNA Asp1的tRNA体而言,由于成为仅源自1种类的tRNA的tRNA体,因此,不包含在嵌合tRNA体中。可按照tRNA的32～38位的碱基序列信息,按照以下基准确定源自的tRNA:UUxxxAC＝Ala1B,AUxxxAU＝Ala2,CUxxxGA＝Arg3,CUxxxAC＝Glu2或Asp1,UUxxxGU＝Leu2,Leu1或Leu3,UUxxxAA＝Phe,Cys,Gly1,Gly3,Leu4,Leu5,Thr1,Thr2或Thr3,AUxxxGU＝Pro2,UUxxxGA＝Pro3或Pro1,CUxxxAA＝Ser5,Arg2,Arg4,Arg5,Asn,Gly2,Ile1,Ile2,Lys,Met,Ser1,Ser2,Ser3,Thr4,Trp,Tyr1,Tyr2或Val1,UUxxxAU＝Val2(Val2A及Val2B的总称),Gln1,Gln2,或His(在此,xxx表示反密码子的3个碱基)。例如,确定在32～38位的碱基序列为UUxxxGU的tRNA中,32,33,37及38位的碱基的组合源自tRNA Leu2,tRNA Leu1或tRNA Leu3。

[0318] 某碱基,某碱基的组合,或碱基序列“源自”某起源是指该碱基,某碱基的组合,或者碱基序列,或与该碱基,该碱基的组合,或者碱基序列高度类似的序列是从某起源分离的。例如,构成某tRNA的碱基,某碱基的组合,或碱基序列是从某特定的种类tRNA分离的情况下,表述为该碱基,某碱基的组合,或碱基序列“源自”上述特定种类的tRNA。

[0319] 在本公开中,tRNA有时如下标记。

[0320] •“tRNA Xxx”或“tRNA(Xxx)”:表示具有以Xxx识别的特定的碱基序列的tRNA体。可列举例如tRNA Glu2或tRNA(Glu2),tRNA Ser5或tRNA(Ser5),tRNA AsnE2或tRNA

(AsnE2),tRNA Asp1或tRNA(Asp1)。

[0321] •“tRNA(Xxx)nnn”:表示具有以Xxx识别的特定的tRNA体的tRNA,反密码子序列为nnn的全长tRNA。可列举例如tRNA(Glu2)uga,tRNA(AsnE2)uga。

[0322] •“tRNA(Xxx+Yyy)”:表示嵌合tRNA体,所述嵌合tRNA体在除32,33,37及38位以外具有以Xxx识别的特定的碱基序列,在32,33,37及38位具有以Yyy识别的特定的碱基的组合。可列举例如tRNA(Glu2+Ser5),tRNA(AsnE2+Phe)。

[0323] •“tRNA(Xxx+Yyy)nnn”:表示全长tRNA,所述全长tRNA具有嵌合tRNA体,所述嵌合tRNA体在除32,33,37及38位以外具有以Xxx识别的特定的碱基序列,在32,33,37及38位具有以Yyy识别的特定的碱基的组合,所述全长tRNA的反密码子序列为nnn。可列举例如tRNA(Glu2+Ser5)uga,tRNA(AsnE2+Phe)uga。

[0324] •有时通过在上述tRNA的名称的最后附上“-CA”,由此表示去除tRNA的3′末端的CA序列。可列举例如,tRNA(Glu2)-CA,tRNA(Glu2)uga-CA,tRNA(Glu2+Ser5)-CA,tRNA(Glu2+Ser5)uga-CA。

[0325] 在本公开中,有时将tRNA的32,33,37及38位的碱基的特定的组合以其源自的tRNA的名称标记。在本公开中,32～38位的碱基序列以XXxxxXX表示,tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合如下命名:Ala1B序列＝UUxxxAC,Ala2序列＝AUxxxAU,Arg3序列＝CUxxxGA,Glu2序列＝CUxxxAC,Leu2序列＝UUxxxGU,Phe序列＝UUxxxAA,Pro2序列＝AUxxxGU,Pro3序列＝UUxxxGA,Ser5序列＝CUxxxAA,Val2序列＝UUxxxAU。

[0326] “起始tRNA(initiator tRNA)”是指用于mRNA的翻译的起始时的特定的tRNA。结合有起始氨基酸的起始tRNA,通过被翻译起始因子(initiation factor;IF)催化而导入核糖体,与mRNA上的起始密码子结合,由此翻译开始。作为起始密码子,通常可使用为甲硫氨酸的密码子的AUG,因此,起始tRNA具有与AUG对应的反密码子,另外,作为起始氨基酸结合甲硫氨酸(原核生物中为甲酰甲硫氨酸)。作为起始tRNA的实例,可列举tRNA fMet(SEQ ID No:283,284)。

[0327] “延长tRNA(elongator tRNA)”是指翻译工序的肽链的延长反应中使用的tRNA。在肽合成中,肽链的延长反应通过结合有氨基酸的延长tRNA被GTP化的翻译延长因子(elongation factor;EF)EF-Tu/eEF-1依次传递给核糖体而进行。作为延长tRNA的实例,可列举对应于各种氨基酸的tRNA(SEQ ID No:274～282,285～319)。

[0328] 本公开中,“翻译体系”定义为用于翻译肽的组合物(在本公开中有时称为“翻译用组合物”)。不意在限定,在典型的翻译体系中,作为构成成分包含核糖体,翻译因子,tRNA,氨基酸,氨酰tRNA合成酶(aaRS),及ATP、GTP等对肽的翻译反应而言必要的因子。作为翻译体系的主要种类,有利用活细胞的翻译体系、利用细胞提取液的翻译体系(无细胞翻译体系(在本公开中“无细胞翻译用组合物”以相同意义使用))。作为利用活细胞的翻译体系,已知例如,在非洲爪蟾卵母细胞、哺乳动物细胞等活细胞中,根据显微注射法、脂质转染法导入期望的氨酰tRNA及mRNA而进行肽翻译的体系(Nowak et al.,Science(1995)268:439-442)。作为无细胞翻译体系的实例,已知利用来自大肠杆菌(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),或者昆虫细胞(Swerdel et al.,Comp Biochem Physiol B(1989)93:803-806)等的提取液的翻译体系。这种翻译体系可以通过本领域技术人员公知的方法,或以其为标准的方法适当制备。在无细胞翻译体系中也包括分别地分离,纯化对肽翻译而言必要的因子,将它们重建而构建成的翻译体系(重建型的无细胞翻译体系)(Shimizu et al.,Nat Biotech(2001)19:751-755)。不意在限定,在重建型的无细胞翻译体系中,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),翻译延长因子(例如EF-Tu,EF-Ts,EF-G),翻译终結因子(例如RF1,RF2,RF3),核糖体再生因子(ribosome recycling factor;RRF),作为能量源的NTP类,能量再生体系,及对翻译而言必要的其它因子等。在一并进行由DNA的转录反应时,可进一步包含RNA聚合酶等。无细胞翻译体系中包含的各种因子能够根据本领域技术人员众所周知的方法分离,纯化,可以使用这些适当构建重建型的无细胞翻译体系。或者也可以利用Genefrontier公司的PURExpress(注册商标),New England BioLabs公司的PURExpress(注册商标)等市售的重建型的无细胞翻译体系。在重建型的无细胞翻译体系的情况下,可以仅重建翻译体系的构成成分中必要的成分,构建期望的翻译体系。

[0329] 使氨基酸·tRNA·氨酰tRNA合成酶的特异性组合包含在翻译体系中,由此在翻译体系中合成氨酰tRNA,所述氨酰tRNA用于肽的翻译。也可以代替上述而将在翻译体系外制备的氨酰tRNA直接用作翻译体系的构成成分(在本公开中,有时称为“预加载(precharge)法”)。作为预加载法,可例示在翻译体系外利用aaRS将氨基酸与tRNA结合的方法,pdCpA法,pCpA法,及使用人工RNA催化剂(Flexizyme)的方法。特别地,当将一部分的非天然氨基酸等用于翻译难以用aaRS进行氨基酰化的氨基酸时,优选通过pdCpA法,pCpA法或使用Flexizyme的方法等,预先用非天然氨基酸进行氨基酰化的tRNA用作构成成分的预加载法。

[0330] 通过在翻译体系中加入mRNA而开始其翻译。在mRNA中,通常包含编码目标的肽的序列,可以进一步包含用于使翻译反应的效率提高的序列(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)。也可以为通过在体系中直接加入预先转录的mRNA,也可以代替mRNA而将包含启动子的模板DNA和适合其的RNA聚合酶(例如,T7启动子和T7 RNA聚合酶等)添加到体系中,从模板DNA转录mRNA的方式。

[0331] “密码子的误读”是指具有特定的反密码子的氨酰tRNA通过识别与该反密码子不互补的密码子,会翻译导入非预期的氨基酸。可列举例如,具有与密码子CCU互补的反密码子AGG的氨酰tRNA错误地识别密码子CCG,由此会在该tRNA上不意料地翻译导入酰化的氨基酸。需要说明的是,由于在天然的遗传密码表中,密码子CCG和CCU都不分配Pro,因此,利用这样的误读的有无而被翻译导入的氨基酸是没有差异的。但是,在重编程遗传密码表,为密码子CCG和CCU分配另外的氨基酸的情况下,该密码子的误读成为问题。

[0332] 在本公开中,“烷基”是指从脂肪族烃除去1个任意氢原子衍生的1价基团,在骨架中不含有杂原子或不饱和的碳-碳键,具有含有氢及碳原子的烃或烃基结构的部分聚集。碳链的长度n为1～20个的范围,作为烷基,可列举例如C_1-C_{10}烷基,C_1-C_6烷基,C_1-C_3烷基等,具体而言可列举甲基、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。

[0333] 在本公开中,“环烷基”是指饱和或部分饱和的环状的1价脂肪族烃基,包括单环、二环、螺环。作为环烷基,可列举例如C_3-C_{10}环烷基,具体而言可列举环丙基,环丁基,环戊基,环己基,环庚基,环辛基,二环[2.2.1]庚基等。

[0334] 在本公开中“烯基”是指具有至少1个双键(2个相邻SP2碳原子)的1价基团。根据双键及取代组分(存在时)的配置不同,双键的几何学形态可以取共同(E)或相反(Z)、顺式或反式构型。可列举直链状或分支链状的烯基,包括包含内部烯烃的直链等。作为烯基,可列举例如C_2-C_{10}烯基、C_2-C_6烯基等,具体而言可列举乙烯基,烯丙基,1-丙烯基,2-丙烯基,1-丁烯基,2-丁烯(包括顺、反)基,3-丁烯基,戊烯基,己烯基等。

[0335] 在本公开中,“炔基”是指具有至少1个三键(2个相邻SP碳原子)的1价基团。可列举直链状或支链状的炔基,包括内部亚烷基。作为炔基,可列举例如C_2-C_{10}炔基,C_2-C_6炔基等,具体而言可列举乙炔基,1-丙炔基,丙炔基,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。

[0336] 在本公开中“芳基”是指1价芳族烃环。作为芳基,可列举例如C_6-C_{10}芳基,具体而言可列举苯基,萘基(例如,1-萘基,2-萘基)等。

[0337] 在本公开中“杂芳基”是指构成环的原子中含有杂原子的芳族性的环的1价基团,任选是部分饱和的。环可以为单环,或2个稠环(例如,苯或单环杂芳基缩合而成的2环式杂芳基)。构成环的原子的数量为例如5-10个(5元-10元杂芳基)。构成环的原子中包含的杂原子的数量为例如1-5个。作为杂芳基,具体而言可列举呋喃基,噻吩基,吡咯基,咪唑基,吡唑基,噻唑基,异噻唑基,噁唑,异噁唑,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,苯呋喃基,苯噻吩基,苯噻二唑基,苯噻唑基,苯噁唑,苯噁二唑基,苯咪唑基,吲哚基,异吲哚基,吲唑基,喹啉,异喹啉,噌啉基,喹唑啉基,喹喔啉基,苯并二氧杂环戊烯基,吲嗪基,咪唑并吡啶等。

[0338] 在本公开中“芳基烷基(芳烷基)”是指同时包含芳基和烷基的基团,例如,上述烷基的至少一个氢原子被芳基取代的基团。作为芳烷基,可列举例如C_5-C_{10}芳基C_1-C_6烷基,具体而言可列举苄基等。

[0339] 在本公开中,“亚烷基”是指从上述“烷基”进一步除去1个任意氢原子而衍生的二价基团,可以是直链状的那些和支链状的那些。作为直链亚烷基,可列举C_2-C_6直链亚烷基,C_4-C_5直链亚烷基等,具体而言可列举-CH_2-,-$(CH_2)_2$-,-$(CH_2)_3$-,-$(CH_2)_4$-,-$(CH_2)_5$-,-$(CH_2)_6$-等。作为支链亚烷基,可列举C_2-C_6支链亚烷基,C_4-C_5支链亚烷基等,具体而言可列举-$CH(CH_3)CH_2$-,-$C(CH_3)_2$-,-$CH(CH_3)CH_2CH_2$-,-$C(CH_3)_2CH_2$-,-$CH_2CH(CH_3)CH_2$-,-$CH_2C(CH_3)_2$-,-$CH_2CH_2CH(CH_3)$-等。

[0340] 在本公开中“亚烯基”为从上述“烯基”进一步除去1个任意氢原子而衍生的二价基团,可以是直链状的那些和支链状的那些。根据双键及取代基(存在时)的配置不同,可以取共同(E)或相反(Z)、顺式或反式构型。作为直链亚烯基,可列举C_2-C_6直链亚烯基,C_4-C_5直链亚烯基等,具体而言可列举-CH=CH-,-CH=$CHCH_2$-,-CH_2CH=CH-,-CH=$CHCH_2CH_2$-,-CH_2CH=$CHCH_2$-,-CH_2CH_2CH=CH-,-CH=$CHCH_2CH_2CH_2$-,-CH_2CH=$CHCH_2CH_2$-,-CH_2CH_2CH=$CHCH_2$-,-

$CH_2CH_2CH_2CH=CH-$等。

[0341] 在本公开中“亚芳基”是指从上述芳基进一步除去1个任意氢原子而衍生的2价基团。环可以为单环也可以为稠环。构成环的原子的数量没有特别限定，例如6-10个(C_6-C_{10}亚芳基)。作为亚芳基，具体而言可列举亚苯基，亚萘基等。

[0342] 在本公开中，“杂亚芳基”是指从上述杂芳基进一步除去1个任意氢原子而衍生的2价基团。环可以为单环也可以为稠环。构成环的原子的数量没有特别限定，例如5-10个(5元～10元杂亚芳基)。作为杂亚芳基，具体而言可列举吡咯二基，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，呋喃二基及噻吩二基等。

[0343] ＜组合物，试剂盒，方法＞

[0344] 一个方面，本公开涉及包含结合第一氨基酸的第一tRNA和结合第二氨基酸的第二tRNA的翻译用组合物，及翻译用试剂盒。另一个方面，本公开涉及使用结合第一氨基酸的第一tRNA和结合第二氨基酸的第二tRNA翻译核酸的方法。通过使用该组合物，试剂盒及方法，可以降低或抑制由基于tRNA的密码子的误读引起的非预期的氨基酸的误译。因此，一个方面，本公开涉及降低或抑制由基于tRNA的密码子的误读而制备肽的方法，以及用于该方法的组合物及试剂盒等。

[0345] 本公开的组合物中除了本公开的tRNA以外，可以包含对核酸的翻译而言通常使用的缓冲液、物质等。另一个方面，本公开的tRNA可以与对肽的翻译而言通常使用各种的物质等一起预先封装而以试剂盒形式提供。进一步的方面，本公开的试剂盒中包含的各种物质可以根据其使用方式而为粉末状或者液态。另外，可以将它们收纳在适当的容器中，合适的时候使用。

[0346] ＜tRNA及tRNA体＞

[0347] 一些实施方式中，本公开的tRNA的32，33，37及38位的碱基的组合可以为

[0348] (1)32U，33U，37G，38A，

[0349] (2)32A，33U，37G，38U，

[0350] (3)32A，33U，37A，38U，

[0351] (4)32U，33U，37G，38U，

[0352] (5)32U，33U，37A，38U，或

[0353] (6)32C，33U，37G，38A。

[0354] 一些实施方式中，本公开的tRNA可以为32，33，37及38位选自由上述(1)～(4)；上述(1)～(3)；或，上述(1)，(3)及(4)组成的组的碱基的组合的tRNA，或可以为上述(1)；上述(2)；上述(3)；上述(4)；上述(5)；或，上述(6)的碱基的组合的tRNA。一些实施方式中，本公开的tRNA的32，33，37及38位的碱基均不为修饰碱基。

[0355] 在本公开中，本公开的第一tRNA的反密码子有时以$N_{11}N_{12}N_{13}$表示，本公开的第二tRNA的反密码子有时以$N_{21}N_{22}N_{23}$表示。上述N_{11}，N_{12}，及N_{13}以及$N_{21}N_{22}N_{23}$可以各自独立地为A，C，G，或U。本公开的tRNA的反密码子的第一个字母，第二个字母，及第三个字母可以各自独立地为A，C，G，或U。本公开的tRNA的反密码子的第二个字母和第三个字母的碱基序列可以为CC，GC，AC，GU，CG，GG，AG，或GA，或可以为GG，AG，或CC。一些实施方式中，上述反密码子的第二个字母和第三个字母的碱基序列不为CG。一些实施方式中，本公开的tRNA在反密码子

中不具有修饰碱基,或,反密码子的第一个字母为修饰碱基,也可以是该第一个字母的核苷具有后述的修饰。

[0356] 一些实施方式中,本公开的tRNA为源自原核生物的tRNA或源自真核生物的tRNA。可以通过改变源自原核生物的tRNA或源自真核生物的tRNA而制作tRNA,通过改变制作的tRNA可以与源自原核生物的tRNA或源自真核生物的tRNA具有最高碱基序列同一性。真核生物进一步分类为动物,植物,菌类及原生生物。本公开的tRNA例如可以为源自人的tRNA。原核生物进一步分类为真细菌和古细菌。作为真细菌,可列举例如大肠杆菌,枯草杆菌,乳酸菌,或哈夫尼脱硫杆菌(Desulfitobacterium hafniense)等。作为古细菌,可列举例如高度嗜盐细菌,嗜热细菌,或甲烷细菌(例如马氏甲烷八叠球菌(Methanosarcina mazei)、巴氏甲烷八叠球菌(Methanosarcina barkeri)、詹氏甲烷球菌(Methanocaldococcus jannaschii))等。本公开的tRNA可以为源自例如大肠杆菌、哈夫尼脱硫杆菌(Desulfitobacterium hafniense)、马氏甲烷八叠球菌(Methanosarcina mazei)的tRNA。

[0357] 一些实施方式中,本公开的tRNA可以相对于参比tRNA的碱基序列有1或多个碱基不同,可以有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个以上或12个以上的碱基不同,可以有1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11或12个碱基不同,可以有15个以下,14个以下,13个以下,12个以下,11个以下,10个以下,9个以下,8个以下,7个以下,6个以下,5个以下,4个以下,3个以下,或2个以下碱基不同。一些实施方式中,本公开的tRNA与参比tRNA的碱基序列相比,可以具有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,或者98%以上的序列同一性。在本公开中,相对于某碱基序列为"百分比(%)序列同一性"的定义为:在以能得到最大的百分比序列同一性的方式将序列排列,且在必要时导入空位(Gap)后,且将任何保守取代也不看做序列同一性的一部分时的,候选序列中的与参比碱基序列中的碱基相同的碱基的百分率比。对以决定碱基序列的百分比序列同一性为目标的比对而言,可以通过使用处于该技术领域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)(GENETYX CORPORATION)等能够公开获取的计算机软件实现。本领域技术人员可以确定用于取得序列的对齐的适当参数,包括用于在要比较的序列的全长中实现最大的对齐而需要的任意算法。

[0358] 一些实施方式中,本公开的tRNA的反密码子环(32～38位)的碱基序列可以与参比tRNA的碱基序列不同。某些实施方式中,本公开的tRNA可以具有嵌合反密码子环。本公开的"嵌合反密码子环"是指反密码子环,其32,33,37及38位的碱基与反密码子的碱基序列源自的tRNA不同。例如,包含反密码子UGA的反密码子环是否属于嵌合反密码子环可如后续那样判定。首先,作为具有反密码子UGA的tRNA,鉴定了源自大肠杆菌的tRNA Ser1(SEQ ID No:306),因此,可确定反密码子UGA源自tRNA Ser1(确定反密码子的来源时,可以参考SEQ ID No:274～319中记载的tRNA的碱基序列)。其中,上述tRNA Ser1的反密码子环的碱基序列为CUugaAA。因此,在反密码子环中包含的32,33,37及38位的碱基为除了Ser5序列(32C,33U,37A,及38A)以外的碱基的组合的情况下,将该反密码子环判定为嵌合反密码子环。某些实施方式中,本公开的tRNA的反密码子环可以与包含具有SEQ ID No:274～282,285～304,及306～319中任一项所述的碱基序列的tRNA的反密码子环(tRNA编号规则的32～38位)不同。一些实施方式中,本公开的tRNA的体相对于参比tRNA的体的碱基序列可以有1或多个碱基

不同,也可以有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个以上或12个以上的碱基不同,也可以有1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11或12个碱基不同,可以有15个以下,14个以下,13个以下,12个以下,11个以下,10个以下,9个以下,8个以下,7个以下,6个以下,5个以下,4个以下,3个以下,或2个以下的碱基不同。一些实施方式中,本公开的tRNA体与参比tRNA体的碱基序列相比,可以具有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,或者98%以上的序列同一性。一些实施方式中,本公开的tRNA可以在选自由其32,33,37及38位组成的组中的至少一个中与参比tRNA的碱基不同。一些实施方式中,本公开的tRNA体可以在选自由32,33,37及38位组成的组中的至少一个中与参比tRNA体的碱基不同。一些实施方式中,本公开的tRNA的特征为天然不存在的tRNA。某些实施方式中,本公开的tRNA体可以为不源自具有SEQ ID No:275所述的碱基序列的tRNA的tRNA体,和/或可以为不源自具有SEQ ID No:294,295,及296所述的碱基序列的tRNA中的任一的tRNA体,和/或可以为不源自具有SEQ ID No:302,303,及304所述的碱基序列的tRNA中的任一的tRNA体。某些实施方式中,在本公开的tRNA体的32,33,37及38位为Leu2序列的情况下,tRNA体可以为不源自具有SEQ ID No:294,295,及296所述的碱基序列的tRNA中的任一,在为Ala2序列的情况下,tRNA体可以为不源自具有SEQ ID No:275所述的碱基序列的tRNA,在为Pro2序列或Pro3序列的情况下,tRNA体可以为不源自具有SEQ ID No:302,303,及304所述的碱基序列的tRNA中的任一。

[0359] 对本公开的参比tRNA及参比tRNA体而言,可以分别为源自任意生物(例如大肠杆菌)的天然tRNA或其体,或可以为人工合成的与天然tRNA不同的序列而成的非天然tRNA或其体,或者,可以为人工合成天然tRNA等序列而成的tRNA(人工tRNA)或其体,可以为人工组合源自不同的tRNA而成的tRNA嵌合或其体。

[0360] 本公开的参比tRNA或参比tRNA体可以分别从具有任意碱基序列的tRNA或tRNA体中适当选择。一些实施方式中,参比tRNA或参比tRNA体可以选自由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,及tRNA Sec(硒代半胱氨酸)(SEQ ID No:274～282,285～319),以及,tRNA Glu2,tRNA AsnE2,及tRNA Asp1(SEQ ID No:322～324)组成的组中的至少一个tRNA或其体。也可以作为参比使用tRNA fMet(SEQ ID No:283,284),tRNA Pyl(tRNA pyrrolysine),tRNA AsnE2(参考Ohta,A.;Murakami,H.;Higashimura,E.;Suga,H.Chem.Biol.2007,14,1315-1322.),其体等。另外,作为参比,也可使用将tRNA Glu2的T茎移植至tRNA Pro1,进一步加入突变的tRNA嵌合的tRNA Pro1E2(参考WO2019/077887),其体等。特定的实施方式中,本公开的tRNA或tRNA体可以为选自由tRNA Glu2,tRNA Asp1,及tRNA AsnE2组成的组中的至少一个tRNA或其体。对于一些tRNA体,将1～74位的例示的碱基序列示于SEQ ID No:253～255,320,321。需要说明的是,在此示例的参比tRNA体也可以作为在本公开的嵌合tRNA体中,除了反密码子环以外的部分的来源原始的序列使用。

[0361] 一些实施方式中,对本公开的tRNA或tRNA体具有的与参比tRNA或参比tRNA体的差异而言,也可以基于参比tRNA或参比tRNA体的序列信息(例如,碱基序列信息),通过改变该序列的一部分而产生。在该情况下,如果一次得到了本公开的tRNA或tRNA体的序列信息,则可以之后不需要参比序列信息而制备本公开的tRNA或tRNA体。在本公开中,“改变”是指对

于现有的tRNA或tRNA体的碱基序列(现有序列)导入选自下组的至少1种改变,至少1个,或2,3,4,5,6,7,8,9,10,11或12个以上:(i)加成(在现有序列加入任意新的碱基),(ii)缺失(从现有序列删除任意核苷酸),(iii)取代(将现有序列中的任意碱基取代为另外的任意碱基),(iv)插入(在现有序列的任意2个核苷酸之间追加新的任意核苷酸),(v)修饰(使现有序列中任意核苷的结构的一部分(例如碱基部分、糖部分)变化为另外的结构)。改变可以对于tRNA或tRNA体的任何结构(例如D臂,反密码子臂,T臂,受体茎,可变环等)进行。特定的实施方式中,本公开的tRNA或tRNA体的改变为对于tRNA的选自由32,33,37及38位的组,或选自由32,37及38位组成的组中的至少1个,2个以上,3个以上,或4个碱基进行。一些实施方式中,本公开的tRNA及tRNA体也可以不为实际基于参比tRNA或参比tRNA体而改变的那些。在本公开的tRNA及tRNA体中,也包括具有对于参比tRNA或参比tRNA体进行如上所述的改变的情况下得到的碱基序列的tRNA或tRNA体。

[0362] 作为本公开的改变,可列举取代碱基而使得例如,tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合与本公开的tRNA的相应部位的碱基的组合相同。对取代前的碱基没有特别限定,例如,取代前的32位的碱基可以为C或U,取代前的37位的碱基可以为A,取代前的38位的碱基可以为A或C,和/或,取代前的33位的碱基可以为U。一些实施方式中,在32,33,37或38位的碱基已经为期望的碱基的情况下,不需要进行取代。例如,在取代前的tRNA的33位的碱基为U,33位的期望的碱基也为U的情况下,不需要进行33位的碱基的取代。

[0363] 一些实施方式中,本公开的tRNA可以具有嵌合tRNA体。作为嵌合tRNA体,可例示tRNA体的反密码子环部分(即,32,33,37及38位)与其它部分源自不同的tRNA体的嵌合tRNA体。作为嵌合tRNA体的1～74位的碱基序列,可例示以下的。

[0364] [表2]

[0365]

嵌合tRNA体的名称	SEQ ID No:	tRNA体中除了反密码子以外的部分的来源	32，33，37和38位的碱基的组合的来源
tRNA(Glu2+Leu2)-CA	256	tRNA Glu2	tRNA Leu2
tRNA(Glu2+Pro3)-CA	257		tRNA Pro3
tRNA(Glu2+Pro2)-CA	258		tRNA Pro2
tRNA(Glu2+Ala2)-CA	259		tRNA Ala2
tRNA(Glu2+Val2)-CA	260		tRNA Val2
tRNA(Glu2+Arg3)-CA	261		tRNA Arg3
tRNA(Asp1+Leu2)-CA	262	tRNA Asp1	tRNA Leu2
tRNA(Asp1+Pro3)-CA	263		tRNA Pro3
tRNA(Asp1+Pro2)-CA	264		tRNA Pro2
tRNA(Asp1+Ala2)-CA	265		tRNA Ala2
tRNA(Asp1+Val2)-CA	266		tRNA Val2
tRNA(Asp1+Arg3)-CA	267		tRNA Arg3
tRNA(AsnE2+Leu2)-CA	268	tRNA AsnE2	tRNA Leu2
tRNA(AsnE2+Pro3)-CA	269		tRNA Pro3
tRNA(AsnE2+Pro2)-CA	270		tRNA Pro2
tRNA(AsnE2+Ala2)-CA	271		tRNA Ala2
tRNA(AsnE2+Val2)-CA	272		tRNA Val2
tRNA(AsnE2+Arg3)-CA	273		tRNA Arg3

[0366] 一些实施方式中，本公开的tRNA的32～38位的碱基序列可以与大肠杆菌的野生型tRNA，或天然存在tRNA的32～38位的碱基序列不同。不意在限定，一些实施方式中，在本公开的tRNA具有含有32U，33U，37G，38A的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下，反密码子为UGG和/或CGG的tRNA也可以从本公开的tRNA除外。一些实施方式中，在本公开的tRNA具有含有32A，33U，37G，38U的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下，反密码子为AGG和/或GGG的tRNA也可以从本公开的tRNA除外。一些实施方式中，在本公开的tRNA具有含有32A，33U，37A，38U的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下，反密码子为AGC和/或GGC的tRNA也可以从本公开的tRNA除外。一些实施方式中，在本公开的tRNA具有含有32C，33U，37G，38A的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下，反密码子为UCG和/或CCG的tRNA也可以从本公开的tRNA除外。一些实施方式中，在本公开的tRNA具有含有32U，33U，37G，38U的碱基的组合的嵌合tRNA体的情况下，反密码子的第二个字母的碱基为A，且第三个字母的碱基为G的tRNA也可以从本公开的tRNA除外。

[0367] 一些实施方式中，本公开的tRNA中，对除了其反密码子环以外的碱基序列没有特别限定，也可以从tRNA Ala，tRNA Pro及tRNA Leu以外选择。其中，除了上述反密码子环以外的碱基序列可以为tRNA的1～31位及39～76位的碱基序列。

[0368] 一些实施方式中，本公开的tRNA的1～31位及39～74位的碱基序列没有特别限定，可以源自具有选自由(a)SEQ ID No:253，(b)SEQ ID No:255，及(c)SEQ ID No:254组成的

组中的至少1个所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位的碱基序列。特定的实施方式中，本公开的tRNA的1～31位及39～74位的碱基序列可以为具有选自由上述(a)～(c)组成的组中的至少1个所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位的碱基序列。一些实施方式中，本公开的tRNA的1～31位及39～74位的碱基序列可以与具有上述(a)～(c)中任一项所述的碱基序列的tRNA的1～31位及39～74位的碱基序列的序列同一性为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，或者98％以上。

[0369] 一些实施方式中，本公开的tRNA的75位的碱基可以为C，76位的碱基可以为A。本公开的tRNA的75及76位可以为pCpA(包含胞苷及腺苷的二核苷酸)，或pdCpA(包含脱氧胞苷及腺苷的二核苷酸)。一些实施方式中，本公开的tRNA可以为在其3′末端，更具体而言，在3′末端的腺苷残基，更具体而言在3′末端的76位的腺苷残基结合氨基酸的tRNA。

[0370] 作为本公开的修饰，可例示对于tRNA的反密码子的第一个字母的碱基，或核苷进行修饰(例如，取代为赖胞苷(lysidine)，赖胞苷衍生物，胍丁胞苷(Agmatidine)，或胍丁胞苷衍生物)。其中，赖胞苷衍生物是指在赖胞苷的结构的一部分(例如碱部分)加入修饰制作的分子，作为反密码子的一部分使用的情况下，具有与赖胞苷同等的密码子识别能力(形成互补的碱基对的能力)的分子。另外，赖胞苷衍生物是指在赖胞苷的结构的一部分(例如碱基部分)加入修饰制作的分子，作为反密码子的一部分使用的情况下，具有与赖胞苷同等的密码子识别能力(形成互补的碱基对的能力)的分子。在本公开中，有时将受到这里示例的修饰，或其它修饰的碱基称为“修饰碱基”。在本公开中，碱基序列或核酸序列中的“L”是指赖胞苷。

[0371] 天然tRNA中的赖胞苷由称为tRNA Ile-赖胞苷合成酶(tRNA Ile-lysidine synthetase;TilS)酶的作用合成。TilS特异性识别对应于异亮氨酸的tRNA(tRNA Ile2)作为底物，具有将其反密码子的第一个字母(N1)的胞苷(C)改变(转换)为赖胞苷(k2C)的活性。本公开的tRNA的赖胞苷为可以为经由TilS合成的那些，可以为不经由TilS合成的那些。

[0372] 一些实施方式中，本公开的tRNA可以为不包含修饰碱基的tRNA。在本公开中，有时将通过体外转录制备的tRNA称为“转录tRNA”。本公开的tRNA为可以为转录tRNA，可以为不包含修饰碱基的转录tRNA。在本公开中，有时为了与天然存在的天然tRNA区别而使用术语“人工tRNA”。本公开的tRNA可以为人工tRNA，可以为不包含修饰碱基或修饰核苷的人工tRNA。对不包含修饰碱基的tRNA，不包含修饰核苷的tRNA，转录tRNA及人工tRNA的制备方法没有特别限定，例如可以通过从模板DNA通过使用T7 RNA聚合酶等RNA聚合酶的体外转录反应合成tRNA，根据需要纯化RNA而制备。RNA的纯化中可以使用RNeasy试剂盒(Qiagen公司)等。一些实施方式中，本公开的tRNA的碱基可以由A，C，G及U构成。某些实施方式中，本公开的tRNA可以具有由A，C，G，及U组成的碱基。

[0373] 一些实施方式中，本公开的tRNA上可以结合氨基酸。氨基酸通常结合在tRNA的3′末端，更具体而言，3′末端的CCA序列的腺苷残基上。某些实施方式中，上述3′末端的腺苷残基可以为tRNA编号规则的76位。与tRNA结合的氨基酸的具体种类可以分别从以下记载的氨基酸中适当选择，可列举例如非天然氨基酸。

[0374] 本公开的氨基酸中包括α-氨基酸，β-氨基酸，γ-氨基酸等。作为立体结构，包括L型氨基酸，D型氨基酸中的任一。另外，本公开的氨基酸包含天然氨基酸及非天然氨基酸。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),甲硫氨酸(Met),赖氨酸(Lys),精氨酸(Arg),及脯氨酸(Pro)。天然氨基酸通常为L型氨基酸。

[0375] 在本公开中,非天然氨基酸表示不包括天然氨基酸的全部氨基酸,所述天然氨基酸由上述20种α-氨基酸组成。作为非天然氨基酸的实例,可列举β-氨基酸,γ-氨基酸,D型氨基酸,与天然氨基酸的侧链不同的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(在本公开中,有时称为"N取代氨基酸"),羟基羧酸(羟基酸)等。作为N取代氨基酸可例示,N-甲基氨基酸,N-乙基氨基酸,N-丙基氨基酸,正丁基氨基酸,但不限于这些。非天然氨基酸的侧链没有特别限定,除氢原子以外,可以具有例如烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,芳烷基,环烷基等。另外,在α,α-二取代氨基酸的情况下,2个侧链也可以是形成环的。进一步,这些侧链任选具有1个以上的取代基。特定的实施方式中,取代基可以从包含卤原子,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,在本公开中"取代基上具有卤素的C_1-C_6烷基"是指烷基中的至少一个氢原子被取代为卤原子的"C_1-C_6烷基",具体而言包含例如,三氟甲酯、二氟甲酯、氟甲酯、五氟乙基,四氟乙基,三氟乙基,二氟乙基,氟乙基,三氯甲酯、二氯甲酯、氯甲酯、五氯乙基,四氯乙基,三氯乙基,二氯乙基,氯乙基等。另外,例如"具有取代基的C_5-C_{10}芳基C_1-C_6烷基"是指芳基和/或烷基中的至少一个氢原子被取代基取代的"C_5-C_{10}芳基C_1-C_6烷基"。进一步,"有2个以上的取代基"是指作为取代基有某官能团(例如包含S原子的官能团),也进一步包括该官能团具有另外的取代基(例如氨基、卤素等取代基)。作为非天然氨基酸的具体实例,也可以参考WO2013/100132、WO2018/143145等。

[0376] 非天然氨基酸的主链的氨基可以为非取代的氨基(-NH_2基),可以为取代的氨基(-NHR基)。其中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。另外,也可以是脯氨酸那样的,与主链的氨基的N原子结合的碳链与α位的碳原子形成环。取代基可以从包含卤原子,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,可列举N-甲基化,N-乙基化,N-丙基化,正丁基化等,作为芳烷基取代的实例,可列举N-苄基化等。作为N-甲基氨基酸的具体实例,可列举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。

[0377] 作为包含卤原子的取代基的实例,可列举氟(-F),氯(-Cl),溴(-Br),碘(-I)等。

[0378] 作为包含O原子的取代基的实例,可列举羟基(-OH),氧基(-OR),羰基(-C(=O)-R),羧基(-CO_2H),氧基羰基(-C(=O)-OR),羰氧基(-O-C(=O)-R),硫羰基(-C(=O)-SR),羰基硫基(-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),磺酰氨基(-NH-SO_2-R),氨基磺酰(-SO_2-NHR),氨磺酰基氨基(-NH-SO_2-NHR),硫代羧基(-C(=O)-SH),羧基羰基(-C(=O)-CO_2H)等。

[0379] 作为氧基(-OR)的例子,可列举:烷氧基,环烷氧基,烯氧基,炔氧基,芳氧基,杂芳氧基,芳烷氧基等。

[0380] 作为羰基(-C=O-R)的例子,可列举:甲酰(-C=O-H)基,烷羰基,环烷基羰基,烯羰基,炔羰基,芳基羰基,杂芳基羰基,芳烷羰基等。

[0381] 作为氧基羰基(-C=O-OR)的例子,可列举:烷氧基羰基,环烷氧基羰基,烯氧基羰基,炔氧基羰基,芳氧基羰基,杂芳氧基羰基,芳烷氧基羰基等。

[0382] 作为羰氧基(-O-C=O-R)的例子,可列举:烷基羰氧基,环烷基羰氧基,烯羰氧基,炔羰氧基,芳基羰氧基,杂芳基羰氧基,芳烷基羰氧基等。

[0383] 作为硫羰基(-C=O-SR)的例子,可列举:烷基硫羰基,环烷基硫羰基,烯基硫羰基,炔基硫羰基,芳基硫羰基,杂芳基硫羰基,芳烷基硫羰基等。

[0384] 作为羰基硫基(-S-C=O-R)的例子,可列举:烷基羰基硫基,环烷基羰基硫基,烯羰基硫基,炔羰基硫基,芳基羰基硫基,杂芳基羰基硫基,芳烷基羰基硫基等。

[0385] 作为氨基羰基(-C=O-NHR)的例子,可列举烷基氨基羰基,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原子可以被选自由烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组的取代基取代。

[0386] 作为羰基氨基(-NH-C=O-R)的例子,可列举:烷基羰基氨基,环烷基羰基氨基,烯羰基氨基,炔羰基氨基,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原子可以被选自由烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组的取代基取代。

[0387] 作为氧基羰基氨基(-NH-C=O-OR)的例子,可列举:烷氧羰基氨基,环烷氧羰基氨基,烯氧基羰基氨基,炔氧基羰基氨基,芳氧基羰基氨基,杂芳氧基羰基氨基,芳烷氧基羰基氨基等。进一步,与-NH-C=O-OR中N原子结合的H原子可以被选自由烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组的取代基取代。

[0388] 作为磺酰氨基(-$NHSO_2$-R)的例子,可列举:烷基磺酰氨基,环烷基磺酰氨基,烯基磺酰氨基,炔基磺酰氨基,芳基磺酰氨基,杂芳基磺酰氨基,芳烷基磺酰氨基等。进一步,与-NH-SO2-R中N原子结合的H原子可以被选自由烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组的取代基取代。

[0389] 作为氨基磺酰基(-SO_2-NHR)的例子,可列举: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N原子结合的H原子可以被选自由烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组的取代基取代。

[0390] 作为氨磺酰基氨基(-$NHSO_2$-NHR)的例子,可列举:烷基氨磺酰基氨基,环烷基氨磺酰基氨基,烯基氨磺酰基氨基,炔基氨磺酰基氨基,芳基氨磺酰基氨基,杂芳基氨磺酰基氨基,芳烷基氨磺酰基氨基等。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个可以被选自由烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组的取代基取代。但2个H原子都被取代时,可以各自独立地选择取代基,另外,这2个取代基也可以是形成环的。

[0391] 作为包含S原子的取代基的实例,可列举硫醇(-SH),硫基(-S-R),亚磺酰基(-S=O-R),磺酰基(-$S(O)_2$-R),磺基(-SO_3H)等。

[0392] 作为硫基(-S-R)的实例,可列举烷基硫基,环烷基硫基,烯基硫基,炔基硫基,芳基硫基,杂芳基硫基,芳烷基硫基等。

[0393] 作为亚磺酰基(-S=O-R)的例子,可列举烷基亚磺酰基,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。

[0394] 作为磺酰基(-S(O)$_2$-R)的例子,可列举: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。

[0395] 作为包含N原子的取代基的实例,可列举叠氮(-N_3),氰基(-CN),伯氨基(-NH_2),仲氨基(-NH-R),叔氨基(-NR(R′)),脒基(-C(=NH)-NH_2),取代脒基(-C(=NR)-NR′R″),胍基(-NH-C(=NH)-NH_2),取代胍基(-NR-C(=NR″′)-NR′R″),氨基羰基氨基(-NR-CO-NR′R″)等。

[0396] 作为仲氨基(-NH-R)的例子,可列举烷基氨基,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。

[0397] 叔氨基(-NR(R′))中N原子上的2个取代基R及R′可以分别独立地从由烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组中选择。作为叔氨基的实例,可列举例如烷基(芳烷基)氨基等。这些2个取代基也可以是形成环的。

[0398] 取代脒基(-C(=NR)-NR′R″)中N原子上的3个取代基R,R′,及R″可以分别独立选自由氢原子,烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组。作为取代脒基的实例,可列举例如烷基(芳烷基)(芳基)脒基等。这些取代基也可以是互相形成环的。

[0399] 取代胍基(-NR-C(=NR″′)-NR′R″)中N原子上的4个取代基R,R′,R″,及R″′可以分别独立选自由氢原子,烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组。这些取代基也可以是互相形成环的。

[0400] 氨基羰基氨基(-NR-CO-NR′R″)中N原子上的3个取代基R,R′,及R″可以分别独立选自由氢原子,烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组。这些取代基也可以是互相形成环的。

[0401] 作为包含B原子的取代基的实例,可列举硼基(-BR(R′))、二氧基硼基(-B(OR)(OR′))等。B原子上的2个取代基R及R′可以分别独立选自由氢原子,烷基,环烷基,烯基,炔基,芳基,杂芳基,及芳烷基组成的组。这些取代基也可以是互相形成环的。

[0402] 本公开的羟基羧酸中包含α-羟基羧酸,β-羟基羧酸,γ-羟基羧酸等。与氨基酸同样,在羟基羧酸的α位的碳也可以与氢原子以外的侧链结合。作为立体结构,可包含L型及D型中的任意。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定义。作为羟基羧酸的实例,可列举羟基乙酸,乳酸,苯基乳酸等。

[0403] 本公开的氨基酸可以为可翻译的氨基酸。在本公开中,“可翻译”的氨基酸是指可通过翻译合成(例如,使用在本公开中记载的翻译体系)导入肽中的氨基酸。某氨基酸是否能够翻译,可以通过使用使与该氨基酸结合的tRNA的翻译合成实验进行确认。在翻译合成实验中可以使用重建的无细胞翻译体系(例如,参考WO2013100132)。

[0404] 一些实施方式中,作为本公开的氨基酸,可以例示Pic2((2S)-哌啶-2-羧酸),dA((2R)-2-氨基丙酸),MeHph((2S)-2-(甲氨基)-4-苯基-丁酸),SPh2Cl((2S)-2-氨基-3-(2-氯苯氧基)丙酸),MeG(2-(甲基氨基)乙酸),nBuG(2-(丁基氨基)乙酸)等。

[0405] 本公开的非天然氨基酸可以根据以往公知的化学合成法,后述的实施例中记载的合成法,以这些为标准的合成法制备。

[0406] <tRNA的制备>

[0407] tRNA可以通过例如,准备编码期望的tRNA基因的DNA,在其上游配置T7,T3,或者

SP6等适当的启动子,以该DNA为模板使用适合各启动子的RNA聚合酶进行转录反应而合成。另外,tRNA也可以通过从生物学材料纯化而制备。例如,可以从细胞等包含tRNA的材料制备提取液,通过向其中添加包含与tRNA的碱基序列互补的序列的探针而回收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制备。在通过体外的转录合成的tRNA中,通常仅包含4种典型的碱基:腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,及尿嘧啶。另一方面,在细胞内合成的tRNA中,有时也包含对这些进行修饰得到的修饰碱基等。认为天然tRNA中的修饰碱基(例如赖胞苷等)是在通过转录合成tRNA后,通过用于其修饰的酶(例如TilS等)的作用而被特异性导入该tRNA中。

[0408] 氨酰tRNA也可以通过化学和/或生物学的合成法制备。例如,可以使用氨酰tRNA合成酶(ARS),使tRNA与氨基酸结合而合成氨酰tRNA。对氨基酸而言,只要是可成为ARS的底物的那些,可以为天然氨基酸也可以为非天然氨基酸。或者,可以在使天然氨基酸与tRNA结合后,对氨基酸加入化学的修饰。另外,也报告了通过在ARS中导入氨基酸突变,提高相对于非天然氨基酸的作用的许多实例(例如参考WO2006/135096,WO2007/061136,WO2007/103307,WO2008/001947,WO2010/141851,WO2015/120287等),也可以使用这样的突变ARS使tRNA与氨基酸结合。除了使用ARS的方法以外,也可以例如,从tRNA的3′末端除去CA序列,在该处使用RNA连接酶结合氨基酰化的pdCpA(作为核苷,包含脱氧胞苷及腺苷的二核苷酸),由此合成氨酰tRNA(pdCpA法;Hecht et al.,J Biol Chem(1978)253:4517-4520)。也已知取代pdCpA而使用pCpA(作为核苷,包含胞苷及腺苷的二核苷酸)的方法(pCpA法;Wang et al.,ACS Chem Biol(2015)10:2187-2192)。另外,可以通过使用为人工RNA催化剂的Flexizyme,使预先通过酯化而活化的非天然型氨基酸与tRNA结合而合成氨酰tRNA(WO2007/066627,WO2012/026566,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为可将tRNA与氨基酸或羟基酸连接的人工RNA催化剂。本公开的Flexizyme中包含原型的Flexizyme(Fx),及,由原型的Flexizyme修饰而成的二硝基苄基Flexizyme(dFx),增强型Flexizyme(eFx),氨基Flexizyme(aFx)等。

[0409] 一个方面,本公开提供适于肽翻译的一套组的tRNA。一套组的tRNA中包含多个不同种类的tRNA,由这些tRNA可以翻译多个不同种类的氨基酸。一个方面,本公开提供翻译用组合物,其包含适于肽翻译的多个不同种类的tRNA。另一方面,本公开提供上述翻译用组合物的制备方法。另一方面,本公开提供肽的制备方法,其包括提供适于肽翻译的多个不同种类的tRNA。一个方面,上述多个不同种类的tRNA中包含本公开的tRNA。以下记载涉及这些适于肽翻译的一套组的tRNA,翻译用组合物,翻译用组合物的制备方法,降低密码子的误读的方法,及肽的制备方法。

[0410] 一些实施方式中,本公开的一套组的tRNA可以包含上述本公开的tRNA(有时称为本公开的“第一tRNA”)和第二tRNA。作为上述第二tRNA可以使用任意tRNA,可以与上述第一tRNA独立地为上述本公开的tRNA。

[0411] 一些实施方式中,本公开的一套组的tRNA中包含的第一tRNA和第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基可以彼此不同。可以是上述第一tRNA和上述第二tRNA的反密码子的第二个字母的碱基相同,且上述第一tRNA和上述第二tRNA的反密码子的第三个字母的碱基

相同。一些实施方式中，与上述第一tRNA的反密码子互补的密码子和与上述第二tRNA的反密码子互补的密码子可以存在于相同密码子盒内。一些实施方式中，可以通过使用本公开的第一tRNA及本公开的第二tRNA，由此由一个密码子盒翻译至少2种氨基酸。一些实施方式中，可以是上述第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A或G，且上述第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C或U。一些实施方式中，作为上述第一tRNA和上述第二tRNA的各反密码子的第一个字母的碱基，可例示以下组合：(A,C)；(C,A)；(G,C)；(C,G)；(A,U)；(U,A)；(G,U)；(U,G)。其中，(A,C)表示第一tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为A，第二tRNA的反密码子的第一个字母的碱基为C。

[0412] 一些实施方式中，本公开的一套组的tRNA中包含的第一tRNA和第二tRNA的各自的tRNA体可以彼此不同，也可以相同。一些实施方式中，第一tRNA和第二tRNA的1～31位及39～74位的碱基序列可以是相同的，或具有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，或者98％以上的序列同一性。

[0413] 一些实施方式中，本公开的一套组的tRNA中包含的第一tRNA和第二tRNA，可以彼此与不同的氨基酸结合。在本公开中，有时将与第一tRNA结合的氨基酸称为第一氨基酸，与第二tRNA结合的氨基酸称为第二氨基酸。某些实施方式中，选自本公开的第一氨基酸及第二氨基酸中的至少一个可以为非天然氨基酸。即，本公开的一套组的tRNA中的至少一个，或两者可以与非天然氨基酸结合。一些实施方式中，第一tRNA及第二tRNA的一者或两者可以是非天然氨基酸在翻译体系外与tRNA结合而成的tRNA。

[0414] 不意在限定，一些实施方式中，第一tRNA及第二tRNA中的任一或两者为具有32U，33U，37G，及38U的碱基的组合具有的嵌合tRNA体的情况下，可以从本公开的一套组的tRNA中将包含具有选自由以下(L1)～(L4)组成的组中的至少一个反密码子的组合的上述第一tRNA及上述第二tRNA的一套组的tRNA除外：

[0415] (L1)GCG及CCG，以及，CCG及GCG；

[0416] (L2)AAG及UAG，AAG及CAG，以及，UAG及CAG；

[0417] (L3)反密码子的第二个字母的碱基均为C，第三个字母的碱基均为G；以及

[0418] (L4)反密码子的第二个字母的碱基均为A，第三个字母的碱基均为G。

[0419] 本公开的翻译用组合物只要包含本公开的tRNA则没有限制，可以包含对翻译而言必要的构成成分，可以包含与本公开的翻译体系相同的构成成分。本公开的翻译用组合物可以为无细胞翻译体系，可以为重建型的无细胞翻译体系。不意在限定，一些实施方式中，本公开的翻译用组合物可以为用源自大肠杆菌的因子重建的无细胞翻译体系，可以包含核糖体，翻译开始因子，翻译终結因子，翻译延长因子，氨基酸，氨酰tRNA合成酶(aaRS)等。一些实施方式中，本公开的翻译用组合物可以包含源自大肠杆菌的核糖体。一些实施方式中，本公开的tRNA可以是源自大肠杆菌的tRNA。

[0420] 一些实施方式中，本公开的翻译用组合物中可以包含本公开的一套组的tRNA。本公开的翻译用组合物中可以包含1套，2套，3套，4套，5套，6套，7套或8套，或可以包含1套以上，2套以上，3套以上，4套以上，5套以上，或6套以上，或，可以包含8套以下，7套以下，6套以下，5套以下，4套以下，3套以下，或2套以下本公开的一套组的tRNA。进一步的实施方式中，本公开的翻译用组合物中可以包含上述以外的tRNA。

[0421] 一些实施方式中，对本公开的翻译用组合物中包含的本公开的一套组的tRNA而

言，在该翻译用组合物中包含aaRS的情况下，可以是与该aaRS为正交关系的tRNA。与aaRS为正交关系的tRNA是指不被翻译用组合物中存在的aaRS氨基酰化，可以被摄入核糖体中而翻译导入氨基酸的tRNA。作为这样的tRNA，可例示tRNA Glu2，tRNA AsnE2，tRNA Asp1，tRNA Pro1E2等tRNA或源自它们的tRNA。根据需要，可将识别这些tRNA的aaRS从翻译用组合物中除去。一些实施方式中，本公开的翻译用组合物可以不含能够使氨基酸与一套组的tRNA中任一者结合的aaRS。

[0422] 一些实施方式中，利用本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒可降低密码子的误读。本公开的翻译用组合物以及翻译用试剂盒可降低由密码子的误读引起的非预期的氨基酸被翻译导入的比例。对本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒而言，可降低模板mRNA中包含的密码子被具有与该密码子不互补的反密码子的tRNA所翻译的比例。一些实施方式中，本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒可降低由tRNA造成的上述密码子的误读，所述tRNA的反密码子的第二个字母和第三个字母分别与密码子的第二个字母和第一个字母互补，且为可形成沃森克里克型的碱基对的关系，进一步，上述反密码子的第一个字母与上述密码子的第三个字母不互补。一些实施方式中，通过降低该误读，通过使用本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒能够为相同密码子盒内分配两种以上的氨基酸。特定的实施方式中，能够在相同密码子盒内分配两种以上的非天然氨基酸。例如，通过降低基于具有反密码子AGG的tRNA引起的密码子CCG的误读，在保持密码子CCG分配氨基酸的情况下，为与反密码子AGG互补的密码子(例如CCU)分配另外的氨基酸，即能够对相同密码子盒(这里为CCM盒)分配不同的2种氨基酸。

[0423] 像这样，通过降低对相同密码子盒分配了两种以上的氨基酸时产生的密码子的误读导致的翻译导入错误氨基酸的频率，增加为遗传密码表分配的氨基酸的数量，并且能够实现准确的肽翻译。

[0424] 一些实施方式中，根据本公开可以改变tRNA本身的特性，因此，比翻译用组合物中包含的或构成翻译用试剂盒的氨酰tRNA量的调整、半路中停止翻译反应等方法相比，便利性更高。不意在用特定的理论限制，也可认为当为了防止例如由氨酰tRNA枯竭导致的密码子的误读，尝试增加翻译体系的氨酰tRNA量的情况下，产生反向的误读。本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒从不增加翻译体系中的氨酰tRNA量而可以实现准确的肽翻译这方面也有用。某些实施方式中，本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒可通过与上述氨酰tRNA量的调整、半路中停止翻译反应等手段并用，由此可得到更高的密码子的误读降低效果。一种实施方式中，在本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒中，结合被分配了相同密码子盒的不同密码子的不同氨基酸的多种tRNA，可以是互相不引起误读的独立的关系，即具有正交性的(正交)关系。在天然存在的生物的翻译体系中，原本密码子与氨基酸之间建立有严密的对应关系，因此，存在通过将没有正交性的tRNA加到该处，其对应关系崩溃，对翻译体系的功能产生致命的影响的隐患。因此，在本公开的一种实施方式中，在上述多种的tRNA之间建立有正交性成为重要的特征之一。

[0425] 一些实施方式中，本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒在降低密码子的误读，并且能够使诸如UCM，CUM，CCM，CGM，ACM，GUM，GCM，GGM的在天然的遗传密码表中仅分配一种氨基酸的密码子盒分配多种的氨基酸，特别是包含非天然氨基酸的多种的氨基酸。对分配氨基酸者没有特别限制，例如，可以是第一种氨基酸分配至M_1M_2U或M_1M_2C的密码子，第二种

氨基酸分配至M_1M_2A或M_1M_2G的密码子，或也可以是第一种氨基酸分配至M_1M_2U的密码子，第二种氨基酸分配至M_1M_2G的密码子。

[0426] 一些实施方式中，本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒可以包含具有与第二tRNA的反密码子互补的密码子的至少一种的mRNA，和/或，具有与第一tRNA的反密码子互补的密码子的至少一种的mRNA。某些实施方式中，上述两个密码子可以存在于相同mRNA上，也可以存在于不同mRNA上。一些实施方式中，本公开的翻译用组合物可以包含mRNA文库，所述mRNA文库可以包含序列互相不同的复数种mRNA。

[0427] 一些实施方式中，本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒的制备方法可以包括以体外转录制备第一tRNA和/或第二tRNA的工序。一些实施方式中，本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒的制备方法可以包括通过将氨基酸在翻译体系外与tRNA结合而制备本公开的tRNA。可以包括通过将氨基酸在翻译体系外与tRNA结合，制备第一tRNA及第二tRNA。一些实施方式中，本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒的制备方法可以包括上述本公开的tRNA的制备方法。一些实施方式中，上述氨基酸可以为非天然氨基酸。

[0428] 一些实施方式中，本公开的肽的制备方法可以包括使用本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒为模板翻译核酸。对翻译方法没有限制，可列举无细胞翻译(体外翻译)，例如使用重建无细胞翻译体系进行翻译，更具体而言，可例示使用源自大肠杆菌的重建无细胞翻译体系进行翻译。

[0429] 一些实施方式中，本公开的肽的制备方法可以包括，使用本公开的翻译用组合物及翻译用试剂盒翻译具有与第二tRNA的反密码子互补的密码子的mRNA，和/或具有与第一tRNA的反密码子互补的密码子的mRNA。某些实施方式中，上述两个密码子可以包含在相同mRNA中，也可以包含在不同mRNA中。一些实施方式中，本公开的肽的制备方法可以包括使用本公开的翻译用组合物翻译彼此序列不同的复数种核酸，可以包括翻译核酸文库，可以包括翻泽mRNA文库。mRNA可以编码具有期望的或随机的氨基酸序列的肽。可以通过在本公开的翻译体系中添加mRNA，进行该mRNA的成肽的翻译。另一方面，在翻译体系中包含用于将DNA转录为mRNA的RNA聚合酶的情况下，可以通过在本公开的翻译体系中添加DNA，一并进行该DNA向mRNA的转录，及该mRNA的成肽的翻译。

[0430] 一些实施方式中，与上述反密码子互补的密码子可以为在上述反密码子的3个碱基全部形成沃森-克里克型碱基对的密码子，或可以为密码子的第三个字母与上述反密码子的第一个字母形成摆动碱基对的密码子。

[0431] 一些实施方式中，本公开的肽的制备方法可以包括对选自由UCM，CUM，CCM，CGM，ACM，GUM，GCM，及GGM组成的组中的至少1个，2个以上，3个以上，4个以上，5个以上，或6个以上的密码子盒分配复数种氨基酸。即使在这样的情况下也能够实现准确的肽翻译。

[0432] 一些实施方式中，通过本公开的肽的制备方法，在对存在于相同密码子盒内，且第三个字母选自由以下(i)～(iv)组成的组中的至少一个组合的密码子分配不同种类氨基酸，并可降低密码子的误读：(i)U和G，(ii)C和G，(iii)U和A，及(iv)C和A。一些实施方式中，通过本公开的翻译方法，对为UCM3，CUM3，CCM3，CGM3，ACM3，GUM3，GCM3或GGM3的密码子，且上述M3为选自由上述(i)～(iv)组成的组中的至少一个组合的密码子分配不同种类的氨基酸，并且可降低密码子的误读。

[0433] 在本公开中，由基于tRNA的密码子误读的降低可以通过以下评价：使用结合有不

同氨基酸的具有不同反密码子的多个tRNA来翻译一种模板mRNA。作为上述多个tRNA,可以选择具有与作为翻译对象的特定的密码子互补的反密码子的tRNA,及具有与上述密码子存在于相同密码子盒的密码子互补,且与上述反密码子不同的反密码子的tRNA。

[0434] 例如,为了评价基于具有反密码子AGG的tRNA引起的密码子CCG的误读,使用包含具有反密码子AGG的结合有氨基酸AA1的tRNA,及具有反密码子CGG的结合有氨基酸AA2的tRNA翻译体系,翻译包含密码子CCG的模板mRNA。在该情况下,利用在反密码子具有与密码子CCG互补的CGG的tRNA翻译导入的AA2为目标的翻译氨基酸,利用反密码子具有与密码子CCG不互补的AGG的tRNA翻译导入的AA1是由误读产生的翻泽氨基酸。可以将这样的翻译产物的比例作为指标评价误读的降低。

[0435] 作为上述评价中使用的模板mRNA,可以从实施例中记载的MR-1～MR-7中选择使用,也可以使用与作为评价对象的密码子配合的其它mRNA。用于翻译上述模板mRNA的翻译体系可以使用源自原核生物的重建无细胞蛋白质合成体系(例如PURE system)。另外,作为翻译条件可以使用本公开的“翻译条件1”。更详细的翻译方法及评价方法记载在实施例中。

[0436] 在本公开中,对由基于tRNA的密码子误读的降低而言,可以根据误读肽相对于目标物(target molecule)的比例(%)进行评价。使用下式算出上述比例。在与不改变32,33,37及38位的碱基的组合的对照tRNA相比,上述比例更低的情况,判断为评价对象的tRNA具有密码子误读的降低效果。对上述比例的降低率没有特别限定,本公开的tRNA与对照相比,可以显示上述比例降低5%以上,10%以上,20%以上,30%以上,40%以上,或50%以上。在本公开中,有时将正确阅读时得到的肽称为正确阅读时的翻译产物、目标物。

[0437] [数学式1]

[0438] $$\text{误读肽相对于目标物的比例}(\%)=\frac{\text{发生误读时得到的肽的翻译量}(\mu M)}{\text{正确阅读时得到的肽的翻译量}(\mu M)}\times 100$$

[0439] 肽的翻译量可以根据以下方法求出。即,将翻译反应结束后得到的翻译产物溶液进行稀释,使用LC-FLR-MS的装置分析。作为稀释倍率,可例示为10倍。通过从得到的MS数据鉴定为对象的翻译肽的保留时间,将符合保留时间的荧光峰定量,由此评价肽翻译量。定量通过使用标准品制作标准曲线,通过相对定量计算出含量进行。作为上述标准品,可以利用LCT-67或者LCT-12。

[0440] LCT-67的序列以BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:Ile:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:237),LCT-12的序列为,BdpF:Thr:Ile:Phe:Pro:Gly:Phe:Ile:Ile:Thr:Thr:Gly:Thr:Gly:Thr:Gly:Thr:Gly:Ala(SEQ ID No:238)表示。

[0441] 一个方面,本公开提供使用本公开的翻译用组合物制备的肽,及肽文库。本公开的肽中包含进行翻译后化学修饰等得到的肽,另外,也包括核酸与肽连接而成的核酸复合体。

[0442] 作为翻译后化学修饰的实例,可列举直链肽的环状化。作为用于形成环状部的键,可以利用例如,由氨基和羧基形成的肽键。除此以外,也可以利用由适当的官能团的组合形成的酰胺键,二硫键,醚键,硫醚键,酯键,硫基酯键,碳-碳键,烷基键,烯键,膦酸酯醚键,偶氮键,胺键,C＝N-C结合,内酰胺桥联,氨基甲酰键,尿素键,硫脲键,硫基酰胺键,亚磺酰基键,磺酰键,三唑键,苯并噁唑键等。碳-碳结合可以通过铃木(Suzuki)反应,Heck(Heck)反

应,Sonogashira反应等以过渡金属作为催化剂的反应形成。一种实施方式中,本公开的肽包含在分子内可形成上述键的至少1组官能团。环状部的形成也可以在使用本公开的翻译体系制备直链状的肽后,通过另外进行用于与上述的官能团彼此结合的反应而进行。关于具有环状部的肽的合成,也可以参考WO2013/100132,WO2012/026566,WO2012/033154,WO2012/074130,WO2015/030014,WO2018/052002,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(Camb)(2011)47:9946-9958等。

[0443] 已知从使用肽-核酸复合体的肽文库(展示文库)鉴定可与靶分子结合的肽的方法。展示文库为通过肽和编码其的核酸结合而形成1个复合体,由此对表现型和基因型赋予对应的文库。作为主要展示文库的实例,可列举以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),covalent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)等制作的文库。或者,作为展示文库的一种实施方式,也可列举使用体外区室化(compartmentalization)法(Tawfik and Griffiths,Nat Biotechnol(1998)16:652-656)制作的文库。

[0444] 一个方面,本公开提供对于靶分子具有结合活性肽的鉴定方法,其包括使本公开中记载的肽文库接触靶分子。靶分子没有特别限定,可以从例如低分子化合物,高分子化合物,核酸,肽,蛋白质,糖,脂质等中适当选择。靶分子可以为存在细胞外的分子,可以为存在细胞内的分子。或者可以为存在细胞膜上的分子,该情况下,胞外域,膜贯穿结构域,细胞内结构域中的任意可以成为目标。在使肽文库和靶分子接触的工序中,通常,靶分子被固定于一定的固相载体(例如微量滴定板、微球等)。之后,通过除去不与靶分子结合的肽,仅回收与靶分子结合的肽,可以选择性浓缩对于靶分子具有结合活性的肽(淘选法)。在使用的肽文库为核酸展示文库的情况下,回收的肽与编码其遗传信息的核酸进行结合,因此通过分离分析这些,可以容易地鉴定编码回收的肽的核酸序列及氨基酸序列。进一步,也可以基于得到的核酸序列或者氨基酸序列,通过化学合成或者基因重组手段等分别制备被鉴定的肽。

[0445] 一个方面,本公开提供降低由tRNA引起的密码子的误读的方法,用于降低由tRNA引起的密码子的误读的组合物及试剂盒。这样的组合物及试剂盒可以包含本公开的tRNA。另外,该方法可以包括通过改变tRNA得到本公开的tRNA。具体而言降低由上述tRNA引起的第二密码子的误读的方法,其包括对具有与第一密码子互补的反密码子的tRNA的选自由32,33,37及38位组成的组中的至少1个碱基进行取代,其中上述取代后的tRNA为本公开的tRNA,上述第一密码子与上述第二密码子的第一个字母为相同的碱基,上述第一密码子与上述第二密码子的第二个字母为相同的碱基,上述第一密码子与上述第二密码子的第三个字母可以是彼此不同的碱基。

[0446] 一些实施方式中,本公开的降低密码子的误读的方法中,上述第一密码子为M_1M_2X,第二密码子为M_1M_2Y,上述M_1及上述M_2各自独立地为A,C,G或U,而上述X及上述Y可以是分别选自A,C,G及U的彼此不同的碱基。上述X及上述Y的碱基的组合可以为选自由以下(a1)～

(a8)组成的组中的任一种：(a1)U和G；(a2)G和U；(a3)U和A；(a4)A和U；(a5)C和A；(a6)A和C；(a7)C和G；及(a8)G和C。在本公开中，上述X及上述Y的碱基的组合为M_{31}和M_{32}是指上述X为碱M_{31}，且上述Y为碱M_{32}。某些实施方式中为，上述X及上述Y的碱基的组合可以为选自由上述(a1)～(a3)，(a5)及(a7)包含组，或上述(a1)及(a2)组成的组中的任一种。一些实施方式中，上述M_1M_2可以为选自由以下(b1)～(b8)组成的组中的任意碱基序列：(b1)CC；(b2)CU；(b3)GG；(b4)GU；(b5)GC；(b6)UC；(b7)CG；及(b8)AC。某些实施方式中，上述M_1M_2可以是选自由上述(b1)～(b3)组成的组中的任意碱基序列。

[0447] 一些实施方式中，在本公开的降低密码子的误读的方法中，可以是上述第一密码子与上述tRNA的反密码子在3个碱基全部中形成沃森-克里克型碱基对，或，也可以是上述第一密码子的第三个字母的碱基与上述tRNA的反密码子的第一个字母的碱基形成摆动碱基对。

[0448] 一些实施方式中，本公开的降低密码子的误读的方法可以是降低由本公开的第一tRNA的引起，与本公开的第二tRNA的反密码子互补的密码子的误读的方法。一些实施方式中，本公开的降低密码子的误读的方法可以包括上述本公开的tRNA的制备方法。

[0449] 实施例

[0450] 本发明虽然利用以下实施例进行了例示，但并不受限于下述实施例。需要说明的是，实施例中使用了以下缩略词。

[0451] AA 乙酸铵

[0452] CH2CN 氰基甲基

[0453] DBU 1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯

[0454] DCM 二氯甲烷

[0455] DIC N,N-二异丙基碳二亚胺

[0456] DIPEA N,N-二异丙基乙基胺

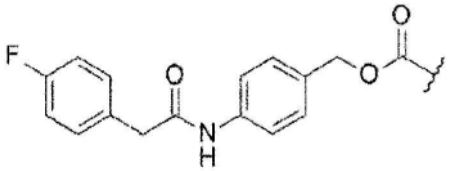
[0457] DMF 二甲基甲酰胺

[0458] DMSO 二甲基亚砜

[0459] FA 甲酸

[0460] Fmoc 9-芴基甲基氧基羰基

[0461] F-Pnaz 4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄氧基羰基：

[0462] 

[0463] HFIP 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇

[0464] MeCN 乙腈

[0465] NMP N-甲基-2-吡咯烷酮

[0466] TEA 三乙胺

[0467] TFA 三氟乙酸

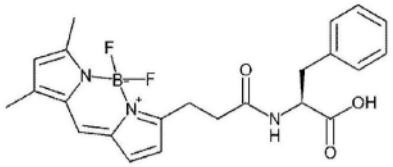
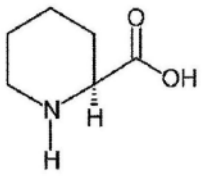
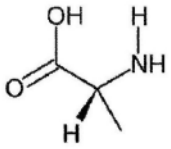
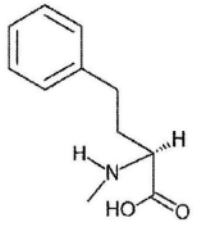
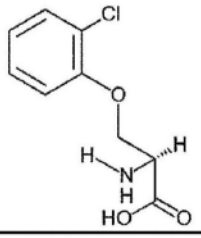
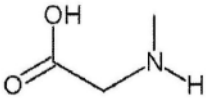
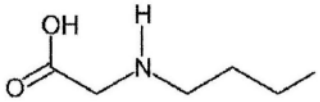
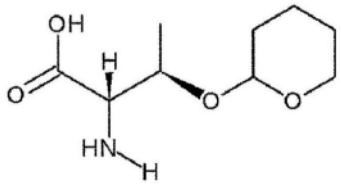
[0468] TFE 2,2,2-三氟乙醇

[0469] THF 四氢呋喃

[0470] 另外，在本实施例中使用了以下缩略词。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)。除了这些以外，在本公开中使用了表3中记载的缩略词。本公开的氨基酸序列中，有时将BdpFL-Phe记作“BdpF”。

[0471] [表3]

[0472]

简称	结构式	简称	结构式
BdpFL-Phe		Pic2	
dA		MeHph	
SPh2Cl		MeG	
nBuG		Thr(THP)	

[0473] 另外，将LCMS的分析条件示于下述表4。

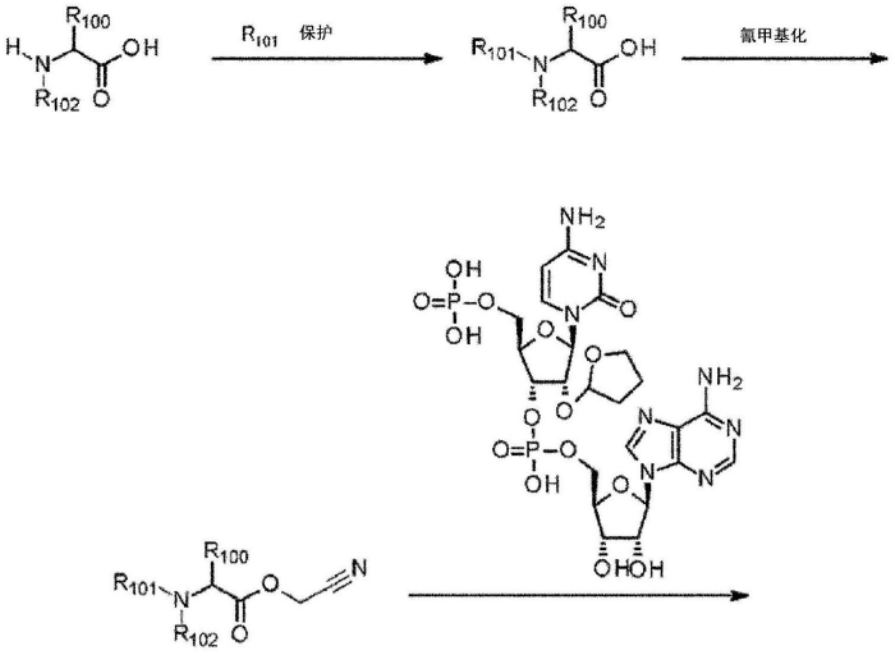
[0474] [表4]

[0475]

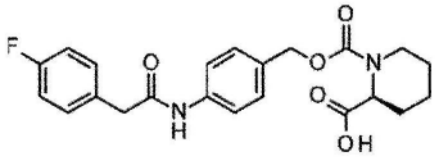
分析条件	装置	柱 (I.D. x 长度(mm))	流动相	梯度(A/B)	流速 (ml/分钟)	柱温 (℃)	波长
SQD FA05_01	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 1.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.0分钟) => 0/100 (0.4分钟)	1.0	35	210-400nm PDA 总计
SQD FA05_02	Acquity UPLC/SQD2	Aldrich Ascentis Express C18 2.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.0分钟) => 0/100 (0.4分钟)	0.9	35	210-400nm PDA 总计
SMD 方法 1	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-Pack XR-ODS 1.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	90/10 => 0/100 (1.1分钟) => 0/100 (0.6分钟)	1.2	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 2	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTECS C18 2.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	90/10 => 0/100 (1.2分钟) => 0/100 (0.5分钟)	1.0	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 3	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTECS C18 2.7μm (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.0分钟) => 0/100 (0.5分钟)	1.0	40	190-400nm PDA 总计
SMD 方法 4	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	Halo C18 2.0μm (2.1 x 30)	A) 0.05% TFA, H2O B) 0.05% TFA CH3CN	95/5 => 0/100 (0.7分钟) => 0/100 (0.25分钟)	0.8	40	190-400nm PDA 总计
SQD AA50long	Acquity UPLC/SQD2	Aldrich Ascentis Express C18 5.0μm (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH4, H2O B) MeOH	50/50 => 0/100 (4.5分钟) => 0/100 (0.5分钟)	0.9	35	210-400nm PDA 总计
LTQ TEA/HFIP05_01	Acquity UPLC/LTQ Orbitrap XL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm (2.1 x 50)	A) 15mM TEA, 400mM HFIP H2O B) 15mM TEA, 400mM HFIP MeOH	95/5 => 10/90 (9.0分钟) => 10/90 (1.0分钟)	0.2	30	190-400nm PDA 总计
LTQ TEA/HFIP05_02	Acquity UPLC/LTQ Orbitrap XL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm (2.1 x 50)	A) 15mM TEA, 400mM HFIP H2O B) 15mM TEA, 400mM HFIP MeOH	95/5 => 95/5 (8.0分钟) => 10/90 (2.0分钟)	0.2	30	190-400nm PDA 总计
LTQ TEA/HFIP05_03	Acquity UPLC/LTQ Orbitrap XL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm (2.1 x 50)	A) 15mM TEA, 400mM HFIP H2O B) 15mM TEA, 400mM HFIP MeOH	95/5 => 70/30 (9.0分钟) => 10/90 (1.0分钟)	0.2	30	190-400nm PDA 总计

[0476] 实施例1.氨酰pCpA的合成

[0477] 按照以下方案,合成了氨酰pCpA(SS14,SS15,SS16,SS45)。

[0478] 

[0479] (S)-1-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)哌啶-2-羧酸(化合物SS17,F-Pnaz-Pic2-OH)的合成

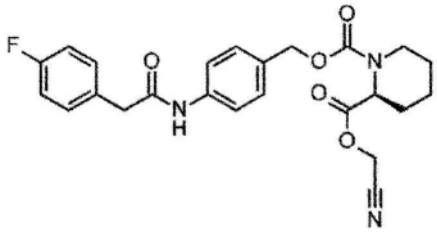
[0480] 

[0481] 在氮气体氛围中,在(S)-哌啶-2-羧酸(42.6mg,0.33mmol),以专利文献(WO2018143145A1)所述的方法合成的碳酸-(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基酯(化合物ts11)(140mg,0.44mmol)的混合物中,于室温添加了DMF(330μL)。于室温搅拌5分钟之后,于0℃添加了三乙胺(105.6μL,2.25mmol)。将反应混合物于室温搅拌30分钟后,通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)进行纯化,得到了(S)-1-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)哌啶-2-羧酸(化合物SS17,F-Pnaz-Pic2-OH)(92mg,67%)。

[0482] LCMS(ESI)m/z=413(M-H)-

[0483] 保留时间:0.70分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0484] (S)-哌啶-1,2-二元羧酸1-(4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)2-(氰基甲基)(化合物SS18,F-Pnaz-Pic2-OCH_2CN)的合成

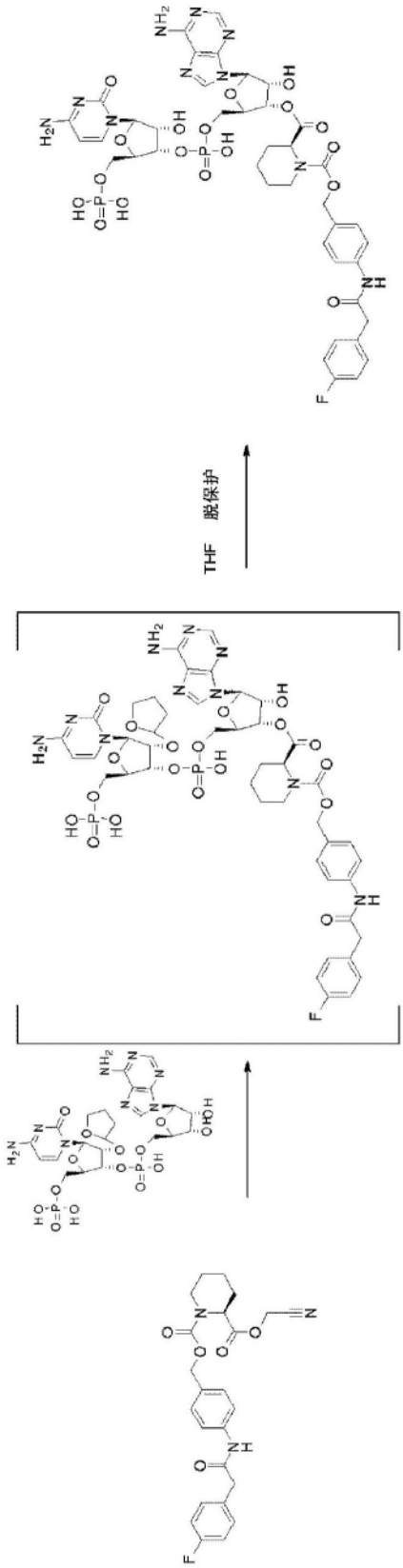
[0485] 

[0486] 在氮气体氛围中,将((S)-1-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)哌啶-2-羧酸(化合物SS17,F-Pnaz-Pic2-OH)(30mg,0.072mmol)及N-乙基-异丙基丙烷-2-胺(DIPEA)(20.23μL,0.116mmol)溶解于乙腈(90μL),于0℃加入2-溴乙腈(5.34μL,0.080mmol),于室温搅拌2小时。将反应液浓缩,得到了粗产物(S)-哌啶-1,2-二元羧酸1-(4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)2-(氰基甲基)(化合物SS18,F-Pnaz-Pic2-OCH_2CN)。将得到的粗产物溶解于乙腈(2.00mL),直接用于后续工序。

[0487] LCMS(ESI)m/z=452(M-H)-

[0488] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0489] (2S)-哌啶-1,2-二元羧酸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-((磷酰氧基)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SS14,F-Pnaz-Pic2-pCpA)的合成

[0490] 

[0491] 使以文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)所述的方法合成的磷酸二氢((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)甲基酯(化合物pc01)(113mg,0.156mmol)溶解在缓冲液A(40mL)中,投

入(S)-哌啶-1,2-二元羧酸1-(4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)2-(氰基甲基)(化合物SS18,F-Pnaz-Pic2-OCH_2CN)(35.4mg,0.078mmol)的乙腈溶液(2.00mL),于室温搅拌150分钟。将反应液冷却至0℃后,加入三氟乙酸(2.00mL)。将反应液于0℃搅拌45分钟后,将反应液利用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)进行纯化,得到了标题化合物(化合物SS14,F-Pnaz-Pic2-pCpA)(6.0mg,7.3%)。

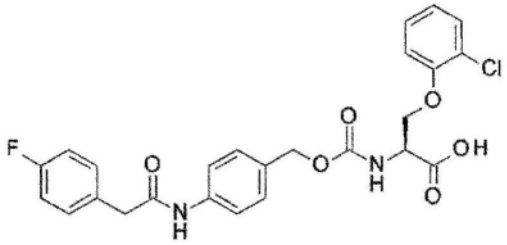
[0492] LCMS(ESI)m/z=1047.5(M-H)-

[0493] 保留时间:0.50分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0494] 需要说明的是,如下制备缓冲液A。

[0495] 在N,N,N-三甲基十六烷-1-氯化铵(6.40g,20mmol)和咪唑(6.81g,100mmol)的水溶液中添加乙酸,得到了pH8,20mM N,N,N-三甲基十六烷-1-铵,100mM咪唑的缓冲液A(1L)。

[0496] O-(2-氯苯基1-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-SPh2Cl-OH)的合成

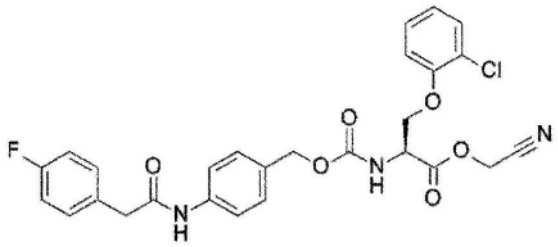
[0497] 

[0498] 在氮气体氛围中,在以专利文献(WO2018225864)所述的方法合成的O-(2-氯苯基)-L-丝氨酸(化合物aa63)(1.25g,5.80mmol),以专利文献(WO2018143145A1)所述的方法合成的碳酸-(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基酯(化合物ts11)(2g,4.71mmol)的混合物中,于室温添加了DMSO(15mL),三乙胺(0.95g,9.42mmol)。将反应混合物于室温搅拌16小时后,通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)进行纯化,得到了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(化合物SS19,F-Pnaz-SPh2Cl-OH)(1.8g,73%)。

[0499] LCMS(ESI)m/z=523(M+Na)+

[0500] 保留时间:1.26分钟(分析条件SMD方法1)

[0501] 氰基甲基O-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙醚氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸酯(化合物SS20,F-Pnaz-SPh2Cl-OCH_2CN)的合成

[0502] 

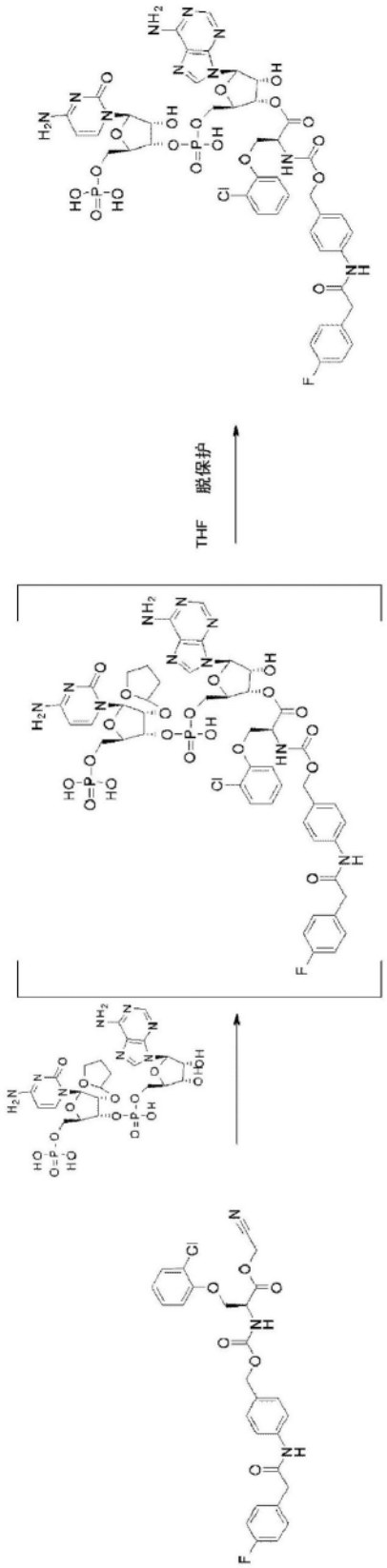
[0503] 在氮气体氛围中,将O-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸(化合物SS19,F-Pnaz-SPh2Cl-OH)(800mg,1.60mmol)及N-乙基-异丙基丙烷-2-胺(DIPEA)(0.412g,3.19mmol)溶解于DCM(15mL),于室温加入2-溴乙腈(760mg,6.34mmol),于室温搅拌16小时。将反应液浓缩,通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)进行纯化,得到了氰基甲基O-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙

酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸酯(化合物SS20,F-Pnaz-SPh2Cl-OCH_2CN)(220mg,26%)。将得到的产物溶解于乙腈(5mL),用于后续工序。

[0504] LCMS(ESI)m/z=562(M+Na)+

[0505] 保留时间:1.15分钟(分析条件SMD方法2)

[0506] (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

[0507] 

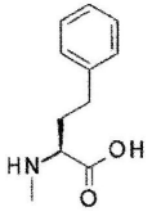
[0508] 使磷酸二氢((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基酯(化合物pc01)(400mg,0.55mmol)溶解在缓冲液A(100mL)中,使用注射泵滴加氰基甲基O-(2-氯苯基)-N-(((4-(2-(4-氟苯基)

乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-L-丝氨酸酯(化合物SS20,F-Pnaz-SPh2Cl-OCH_2CN)(220mg,0.41mmol)的乙腈溶液(5mL),所述滴加经15分钟以上,于室温搅拌5分钟。接下来,向反应液加入三氟乙酸(2.3mL)。将反应液冷冻干燥后后,通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)进行纯化,得到了标题化合物(化合物SS15,F-Pnaz-SPh2Cl-pCpA)(20.7mg,2%)。

[0509] LCMS(ESI)m/z=1133.4(M-H)-

[0510] 保留时间:0.55分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0511] ((S)-2-(甲基氨基)-4-苯基丁酸(化合物SS21,MeHph-OH)的合成

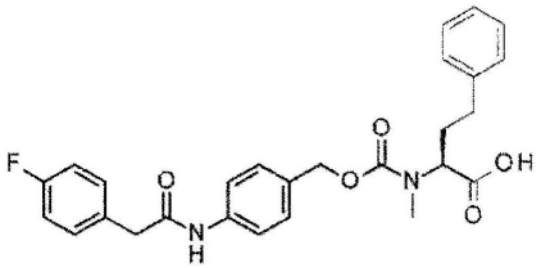
[0512] 

[0513] 在以专利文献(WO2018225864)所述的方法合成的(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)中于室温,于室温添加DCM(903μL),水(903μL)及哌啶(178μL,1.805mmol)。将反应混合物于室温搅拌30分钟后,通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)进行纯化,得到了((S)-2-(甲基氨基)-4-苯基丁酸(化合物SS21,MeHph-OH)(55mg,79%)。

[0514] LCMS(ESI)m/z=192(M-H)-

[0515] 保留时间:0.15分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0516] (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-MeHDh-OH)的合成

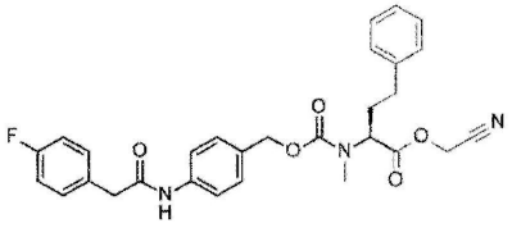
[0517] 

[0518] 在氮气体氛围中,在((S)-2-(甲基氨基)-4-苯基丁酸(化合物SS21,MeHph-OH)(35.1mg,0.182mmol),以专利文献(WO2018143145A1)所述的方法合成的碳酸-(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基酯(化合物ts11)(85mg,0.20mmol)的混合物中,于室温添加了DMSO(727μL)。于50℃添加三乙胺(76μL,0.545mmol)。将反应混合物于40℃搅拌16小时后,通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)进行纯化,得到了(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%)。

[0519] LCMS(ESI)m/z=477(M-H)-

[0520] 保留时间:0.85分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0521] (S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-4-苯基丁酸氰基甲基酯(化合物SS23,F-Pnaz-MeHph-OCH_2CN)的合成

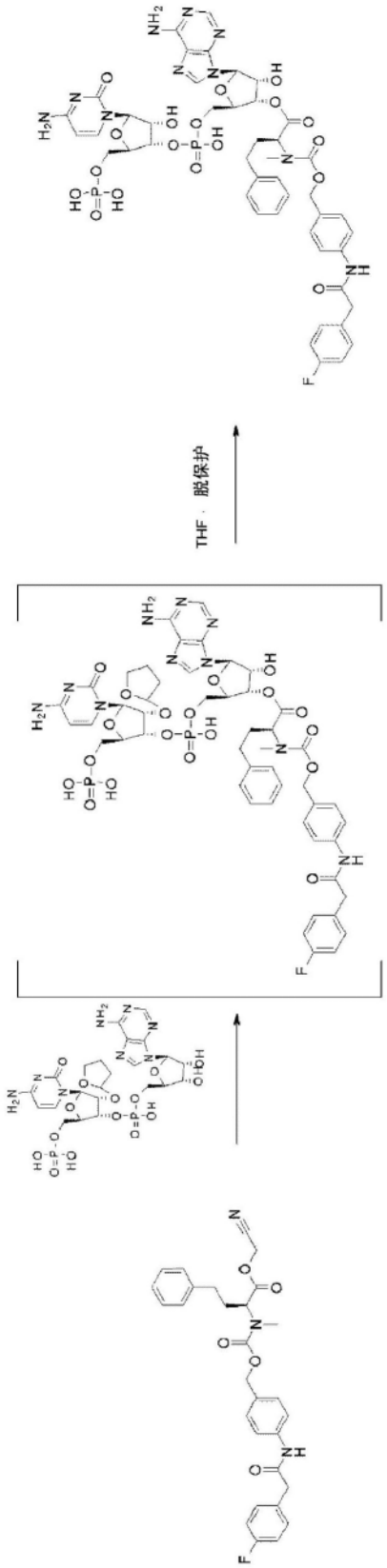
[0522] 

[0523] 在氮气体氛围中,在(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)及N-乙基-异丙基丙烷-2-胺(DIPEA)(31μL,0.176mmol)的混合物中,于室温加入乙腈(533μL)。之后,于室温加入2-溴乙腈(86μL,1.280mmol),将反应混合物于40℃搅拌1小时。将反应液浓缩,得到了粗产物(S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲基)氨基)-4-苯基丁酸氰基甲基酯(化合物SS23,F-Pnaz-MeHph-OCH_2CN)。将得到的粗产物溶解于乙腈(5.00mL),直接用于后续工序。

[0524] LCMS(ESI)m/z=516(M-H)-

[0525] 保留时间:0.92分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0526] (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-基酯(化合物SS16,F-Pnaz-MeHDh-pCpA)的合成

[0527] 

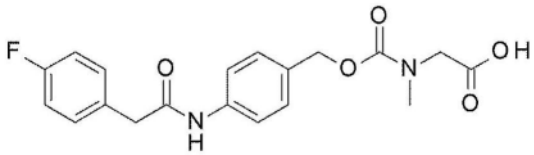
[0528] 使磷酸二氢((2R,3R,4R,5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1(2H)-基)-3-(((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-((四氢呋喃-2-基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基酯(化合物pc01)(127mg,0.176mmol)溶解于缓冲液A(100mL),投入(S)-2-((((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)(甲

基)氨基)-4-苯基丁酸氰基甲基酯(化合物SS23,F-Pnaz-MeHph-OCH_2CN)(83mg,0.16mmol)的乙腈溶液(5.00mL),于室温搅拌1小时。将反应液冷却至0℃后加入三氟乙酸(5.00mL)。将反应液于0℃搅拌1小时后,将反应液利用反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)进行纯化,之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)进行纯化,得到了标题化合物(化合物SS16,F-Pnaz-MeHph-pCpA)(26mg,14.6%)。

[0529] LCMS(ESI)m/z=1111.5(M-H)-

[0530] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0531] N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基甘氨酸(化合物SS46,F-Pnaz-MeG-OH)的合成

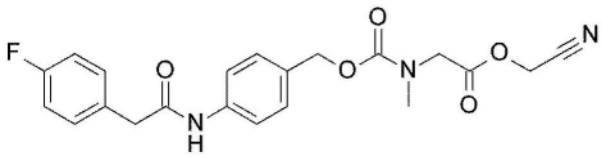
[0532] 

[0533] 在氮气体氛围中,在肌氨酸(Sarcosine)(483mg,5.42mmol),以专利文献(WO2018143145A1)所述的方法合成的碳酸-(4-硝基苯基)-4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基酯(化合物ts11)(2.0g,4.71mmol)的混合物中,于室温DMSO(15mL)添加了三乙胺(953.4mg,9.42mmol)。将反应混合物于室温搅拌16小时后,通过反相硅胶柱色谱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液)进行纯化,得到了N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基甘氨酸(化合物SS46,F-Pnaz-MeG-OH)(1.4g,79%)。

[0534] LCMS(ESI)m/z=397(M+Na)+

[0535] 保留时间:0.88分钟(分析条件SMD方法3)

[0536] 氰基甲基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基甘氨酸酯(化合物SS47,F-Pnaz-MeG-OCH_2CN)的合成

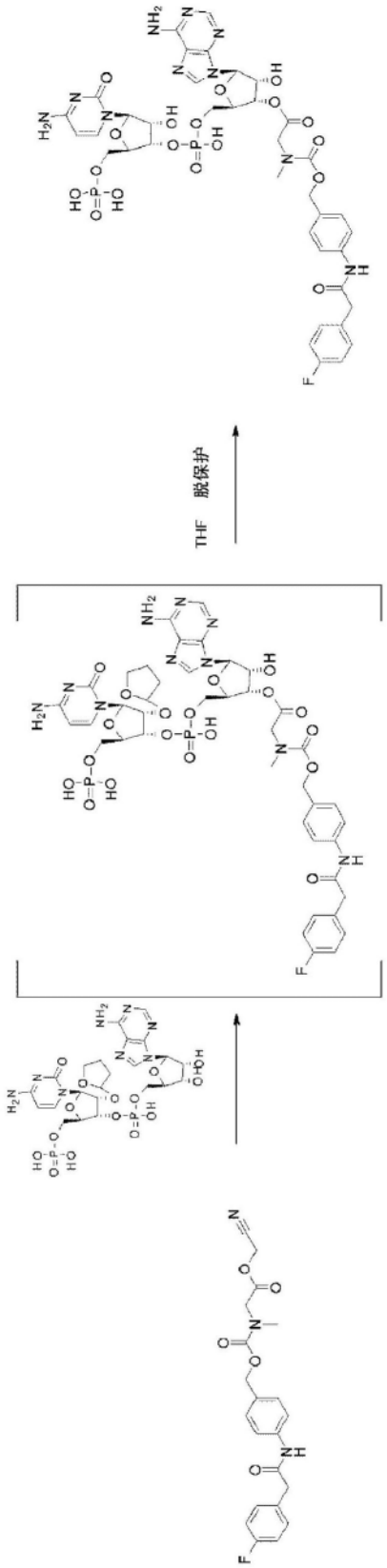
[0537] 

[0538] 在氮气体氛围中,将N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基甘氨酸(化合物SS46,F-Pnaz-MeG-OH)(1.38g,3.69mmol)及N-乙基-异丙基丙烷-2-胺(DIPEA)(0.95g,7.38mmol)溶解于DMF(28mL),于室温加入2-溴乙腈(1.74g,14.75mmol),于室温搅拌16小时。将反应液浓缩,利用正相硅胶柱色谱(乙酸乙酯/石油醚)进行纯化,得到了氰基甲基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基甘氨酸酯(化合物SS47,F-Pnaz-MeG-OCH_2CN)(1.2g,79%)。

[0539] LCMS(ESI)m/z=436(M+Na)+

[0540] 保留时间:0.70分钟(分析条件SMD方法4)

[0541] (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-甲基甘氨酸酯(化合物SS45,F-Pnaz-MeG-pCpA)的合成

[0542] 

[0543] 使以文献(Helv.Chim.Acta,90,297-310)所述的方法合成的磷酸二氢((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)甲基酯(化合物pc01)(422mg,0.58mmol)溶解在缓冲液A(100mL)中,使

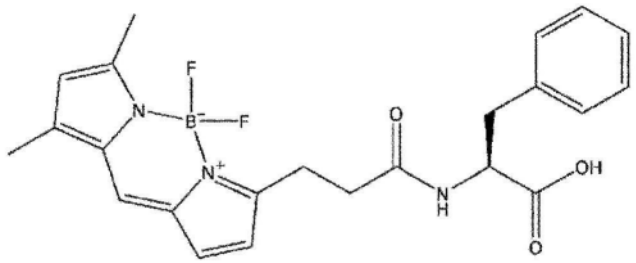
用注射泵滴加氰基甲基N-(((4-(2-(4-氟苯基)乙酰氨基)苄基)氧基)羰基)-N-甲基甘氨酸酯(化合物SS47,F-Pnaz-MeG-OCH_2CN)(120.7mg,0.29mmol)的乙腈溶液(5mL),所述滴加经15分钟以上,于室温搅拌5小时。向反应液加入三氟乙酸(2.3mL),将反应液冷冻干燥后,通过反相硅胶柱色谱(0.05%三氟乙酸水溶液/0.05%三氟乙酸乙腈)进行纯化,得到了标题化合物(化合物SS45,F-Pnaz-MeG-pCpA)(76.7mg,26%)。

[0544] LCMS(ESI)m/z=1007.5(M-H)-

[0545] 保留时间:0.48分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0546] 实施例2.BdpFL-Phe-pCpA(MT01)的合成

[0547] (3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ4,5λ4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯(diazaborinine)-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸(化合物MT02,BdpFL-Phe-QH)的合成

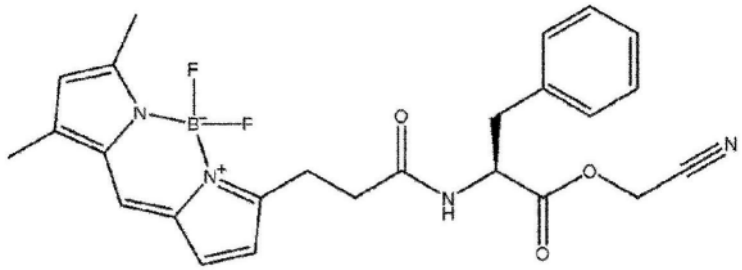
[0548] 

[0549] 在氮气体氛围中,在3-(2-羧基乙基)-5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-5λ4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯-4-鎓(200mg,0.685mmol)和1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(87mg,0.753mmol)的NMP(4.5ml)溶液中于室温加入DIC(0.128ml,0.822mmol)后,于40℃过夜搅拌。恢复到室温后,向反应液加入L-苯丙氨酸(113mg,0.685mmol)和TEA(0.191ml,1.369mmol),于40℃过夜搅拌。将反应液利用反相柱色谱(0.1%FA MeCN/H2O)进行纯化,得到了(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ4,5λ4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸(化合物MT02,BdpFL-Phe-OH)(102mg,34%产率)。

[0550] LCMS(ESI)m/z=438.3(M-H)-

[0551] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0552] (3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ4,5λ4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸氰基甲酯(化合物MT03,BdpFL-Phe-OCH_2CN)的合成

[0553] 

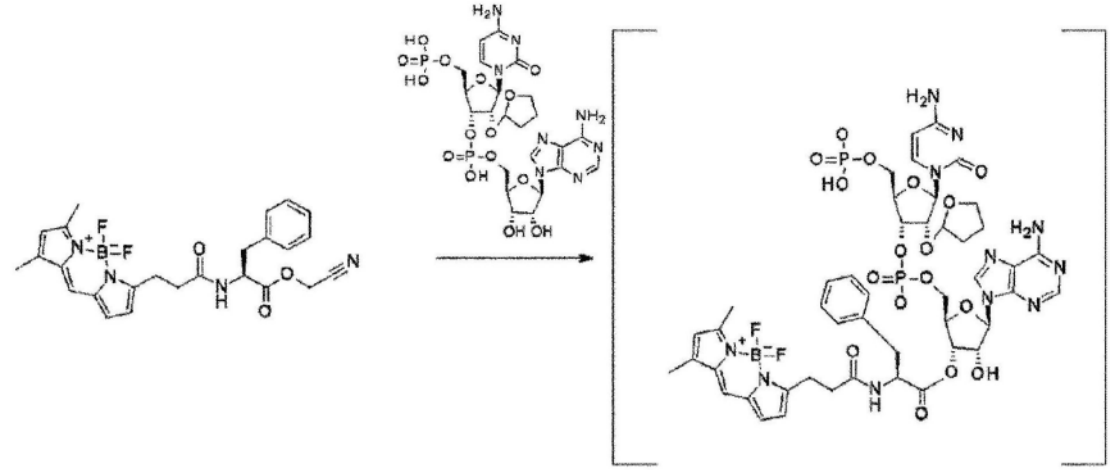
[0554] 在氮气体氛围中,将(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ4,5λ4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸(50mg,0.114mmol)及N-乙基-异丙基丙烷-2-胺(DIPEA)(31.0μL,0.177mmol)溶解于乙腈(500μL),于0℃加入2-溴乙腈(12μL,0.177mmol)后,于40℃搅拌3小时。将反应液浓缩,以粗产物形式得到了(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ4,5λ4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸氰基甲酯(化合物MT03,BdpFL-Phe-OCH_2CN)。得到的粗产物直接用于后续工序。

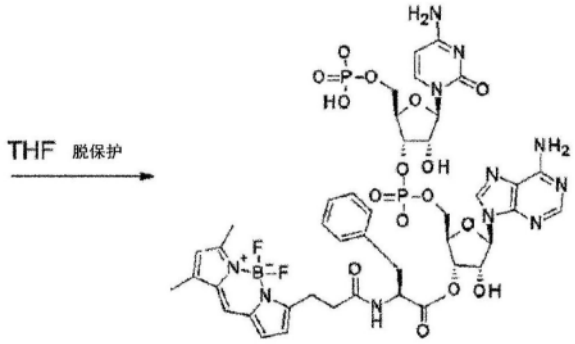
[0555] LCMS(ESI)m/z＝477.3(M-H)-

[0556] 保留时间:0.86分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0557] 3-(3-(((2S)-1-(((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-5λ4-二吡咯并[1,2-c:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯-4-鎓(化合物MT01,BdpFL-Phe-pCpA)的合成

[0558]





[0559] 使磷酸二氢((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)甲基酯(化合物pc01)(33.2mg,0.046mmol)溶解于缓冲液A(11.3mL)中,加入(3-(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ4,5λ4-二吡咯并[1,2-C:2′,1′-f][1,3,2]二氮杂硼苯-3-基)丙酰基)-L-苯丙氨酸氰基甲酯(化合物MT03,BdpFL-Phe-OCH_2CN)(11mg,0.023mmol)的乙腈溶液(0.13mL)后,于室温搅拌45分钟。向反应液于0℃加入TFA(0.56mL),搅拌5分钟后,于室温搅拌10分钟。将反应液利用反相硅胶柱色谱(0.05%TFA MeCN/H2O)进行纯化,得到了标题化合物(化合物MT01,BdpFL-Phe-pCpA)(2.1mg,8.5%产率)。

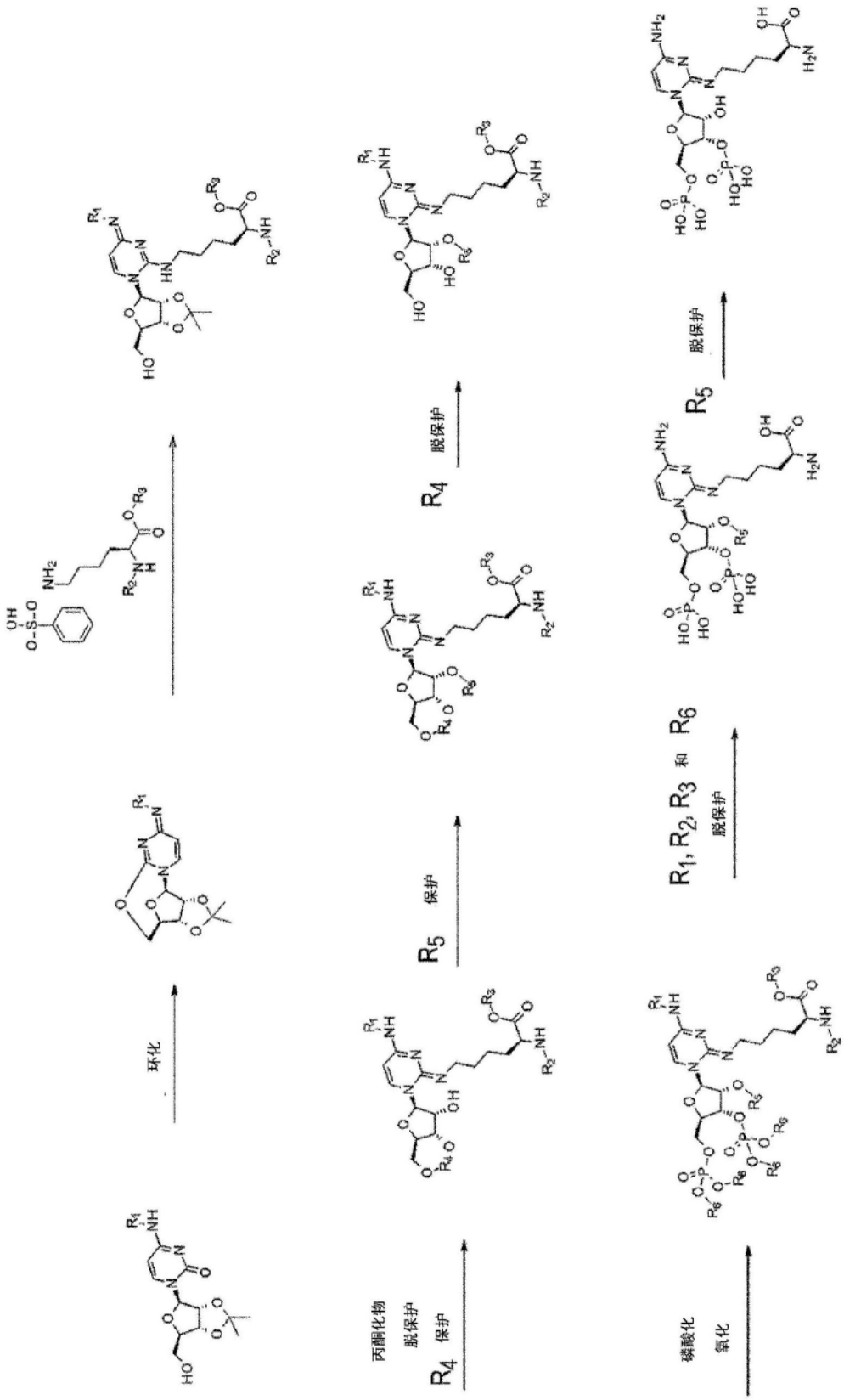
[0560] LCMS(ESI)m/z＝1072.5(M-H)-

[0561] 保留时间:0.56分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0562] 用于通过连接(ligation)法在tRNA片段的3′末端导入赖胞苷单元的赖胞苷-二磷酸盐的合成

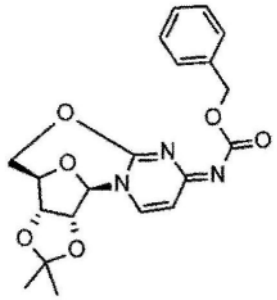
[0563] 改良了用于在tRNA片段的3′末端通过连接法导入赖胞苷单元的赖胞苷的二磷酸盐的合成法。即,按照以下方案合成了赖胞苷-二磷酸盐(SS04,pLp)。

[0564]



[0565] ((3aR,4R,12R,12aR)-2,2-二甲基-3a,4,12,12a-四氢-5H,8H-4,12-环氧基[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-e]嘧啶[2,1-b][1,3]氧氮辛因(oxazocine)-8-亚基亚基)甲基氨酸

苄基酯(化合物SS24)的合成

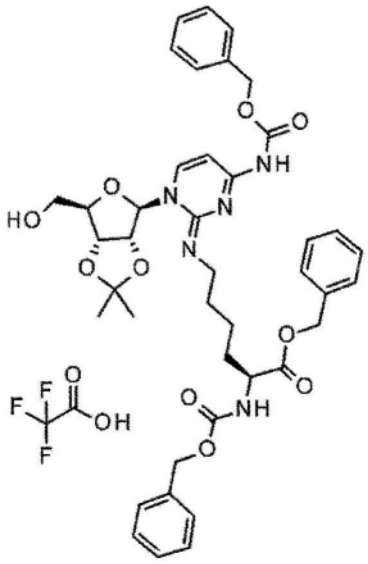
[0566] 

[0567] 在氮气体氛围中,在文献(Antiviral Chemistry&Chemotherapy,2003,14(4),183-194)已知化合物2′,3′-O-异亚丙基-4-N-(苄基-氧基-羰基)-胞苷(718.2mg,1.72mmol)及三苯基膦(474mg,1.81mmol)的混合物中,于室温添加了DCM(17.2mL)。将混合物利用冰浴冷却之后,加入偶氮二元羧酸二异丙基(385μL,1.98mmol)升温至室温后,于室温搅拌1.5小时。将反应液浓缩,加入甲苯(20mL)后,通过过滤回收产生的沉淀物。使用甲苯将得到的固体洗涤3次,得到了((3aR,4R,12R,12aR)-2,2-二甲基-3a,4,12,12a-四氢-5H,8H-4,12-环氧基[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-e]嘧啶[2,1-b][1,3]氧氮辛因-8-亚基)甲基氨酸苄基酯(化合物SS24)(525.7mg,76%)。

[0568] LCMS(ESI)m/z=400.3(M+H)+

[0569] 保留时间:0.48分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0570] 苄基(2S)-6-[[1-[(3aR,4R,6R,6aR)-6-(羟基甲基)-2,2-二甲基-3a,4,6,6a-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS25)的合成

[0571] 

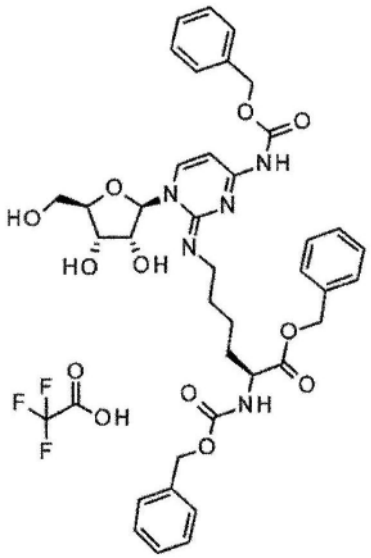
[0572] 在氮气体氛围中,在((3aR,4R,12R,12aR)-2,2-二甲基-3a,4,12,12a-四氢-5H,8H-4,12-环氧基[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-e]嘧啶[2,1-b][1,3]氧氮辛因-8-亚基)甲基氨酸苄基酯(化合物SS24)(300mg,0.75mmol)及氯化锂(159mg,3.76mmol)的混合物中,于室温添加THF(7.5mL),利用冰浴冷却。在冰浴下,向该混合物添加了在苄基((苄氧基)羰基)-L-甘氨酸酯苯磺酸盐(813mg,2.01mmol)及DBU(673μL,4.51mmol)的混合物中加入THF(7.5mL)而成的物质,将反应混合物于0℃搅拌30分钟。冰浴下向反应液加入DMSO,升温至室

温后将反应液浓缩，蒸馏除去THF。将残渣利用反相硅胶柱色谱(0.05％TFA水溶液/0.05％TFA乙腈溶液)进行纯化，定量地得到了苄基(2S)-6-[[1-[(3aR,4R,6R,6aR)-6-(羟基甲基)-2,2-二甲基-3a,4,6,6a-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS25)(726.6mg)。

[0573] LCMS(ESI)m/z＝768.6(M-H)-

[0574] 保留时间:0.74分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0575] 苄基(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS26)的合成

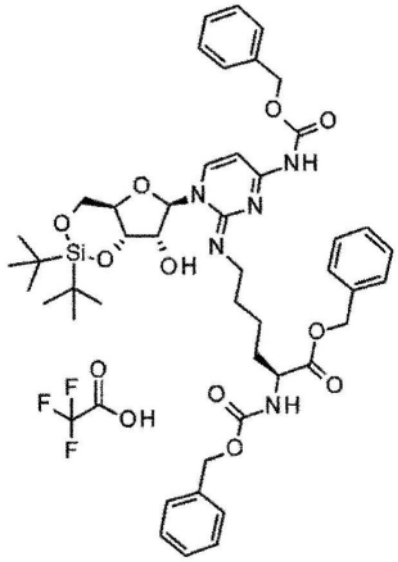
[0576] 

[0577] 将苄基(2S)-6-[[1-[(3aR,4R,6R,6aR)-6-(羟基甲基)-2,2-二甲基-3a,4,6,6a-四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS25)(281.1mg,0.318mmol)在TFA(4.24mL)与超纯水(2.12mL)的混合溶剂中在冰浴中冷却，同时溶解，将混合物于室温搅拌50分钟。加入甲苯及乙腈，将反应液浓缩。多次重复该操作，蒸馏除去水及TFA，得到了粗产物苄基(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS26)(272.6mg)。将得到的粗产物苄基(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS26)直接用于后续工序。

[0578] LCMS(ESI)m/z＝728.5(M-H)-

[0579] 保留时间:0.69分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0580] 苄基(2S)-6-[[1-[(4aR,6R,7R,7aS)-2,2-二叔-丁基-7-羟基-4a,6,7,7a-四氢-4H-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯(dioxasilin)-6-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS27)的合成

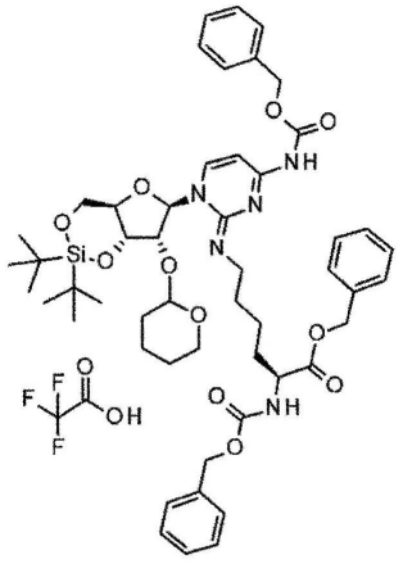
[0581] 

[0582] 在氮气体氛围中,将通过前面工序得到的粗产物苄基(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS26)(258mg,0.306mmol)溶解于DMF(3.06mL),将混合物利用冰浴冷却之后加入二(三氟甲磺酸)二-叔丁基甲硅烷基(396μl,1.22mmol),在冰浴下搅拌2小时。向反应液在冰浴下加入饱和碳酸氢钠水溶液,得到的混合物利用反相硅胶柱色谱(0.05%TFA水溶液/0.05%TFA乙腈溶液)进行纯化,得到了苄基(2S)-6-[[1-[(4aR,6R,7R,7aS)-2,2-二叔-丁基-7-羟基-4a,6,7,7a-四氢-4H-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-6-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS27)(234.0mg,78%,2步)。

[0583] LCMS(ESI)m/z=868.8(M-H)-

[0584] 保留时间:0.88分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0585] 苄基(2S)-6-[[1-[(4aR,6R,7R,7aR)-2,2-二叔-丁基-7-四氢吡喃-2-基氧基-4a,6,7,7a-四氢-4H-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-6-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS28)的合成

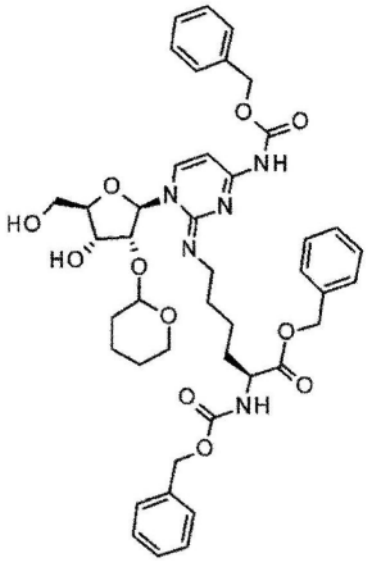
[0586] 

[0587] 在氮气体氛围中,将苄基(2S)-6-[[1-[(4aR,6R,7R,7aS)-2,2-二叔-丁基-7-羟基-4a,6,7,7a-四氢-4H-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-6-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS27)(30mg,0.03mmol)及TFA(6.98μL,0.09mmol)于室温溶解于DCM(610μL),加入3,4-二氢-2H-吡喃(83μL,0.915mmol)。将反应混合物于室温搅拌13小时之后,加入甲苯将反应液浓缩,作为源自THP保护上的不对称碳的非对映体形式混合物得到了粗产物苄基(2S)-6-[[1-[(4aR,6R,7R,7aR)-2,2-二叔-丁基-7-四氢吡喃-2-基氧基-4a,6,7,7a-四氢-4H-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-6-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS28)。将得到的粗产物苄基(2S)-6-[[1-[(4aR,6R,7R,7aR)-2,2-二叔-丁基-7-四氢吡喃-2-基氧基-4a,6,7,7a-四氢-4H-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-6-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS28)直接用于后续工序。

[0588] LCMS(ESI)m/z=952.8(M-H)-

[0589] 保留时间:3.17分,3.38分钟(分析条件SQDAA50long)

[0590] (2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4R,5R)-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-四氢吡喃-2-基氧基-四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸苄基酯(化合物SS29)的合成

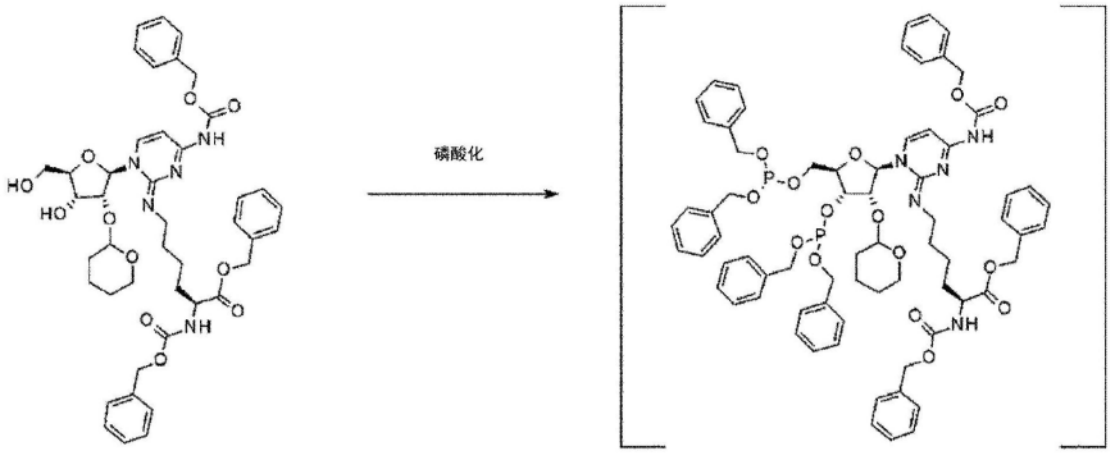
[0591] 

[0592] 在氮气体氛围中,通过前面工序得到的粗产物苄基(2S)-6-[[1-[(4aR,6R,7R,7aR)-2,2-二叔-丁基-7-四氢吡喃-2-基氧基-4a,6,7,7a-四氢-4H-呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-6-基]-4-(苄氧基羰基氨基)嘧啶-2-亚基]氨基]-2-(苄氧基羰基氨基)己酯;2,2,2-三氟乙酸(化合物SS28)于室温溶解于THF(610μL),于室温加入四丁基氟化铵(~1mol/L四氢呋喃溶液)(305μL,~0.305mmol),将反应混合物于室温搅拌30分钟。向反应液加0入DMS浓缩,蒸馏除去THF。将残渣利用反相硅胶柱色谱(10mM AA水溶液/10mM AA乙腈溶液)进行纯化,作为源自THP保护上的不对称碳的非对映体形式混合物得到了(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4R,5R)-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-四氢吡喃-2-基氧基-四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸苄基酯(化合物SS29)(21.51mg,87%,2步)。

[0593] LCMS(ESI)m/z＝812.7(M-H)-

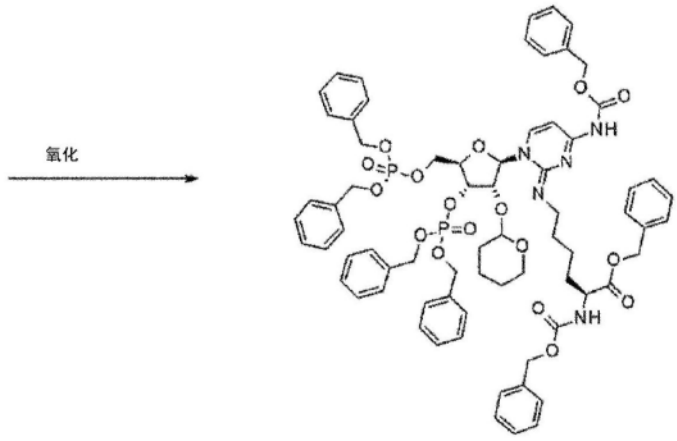
[0594] 保留时间:1.74分钟(分析条件SQDAA50long)

[0595] (2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4R,5R)-4-二苄氧基磷酰基氧基-5-(二苄氧基磷酰基氧基甲基)-3-四氢吡喃-2-基氧基-四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸苄基酯(化合物SS30)的合成



化合物SS29

[0596]



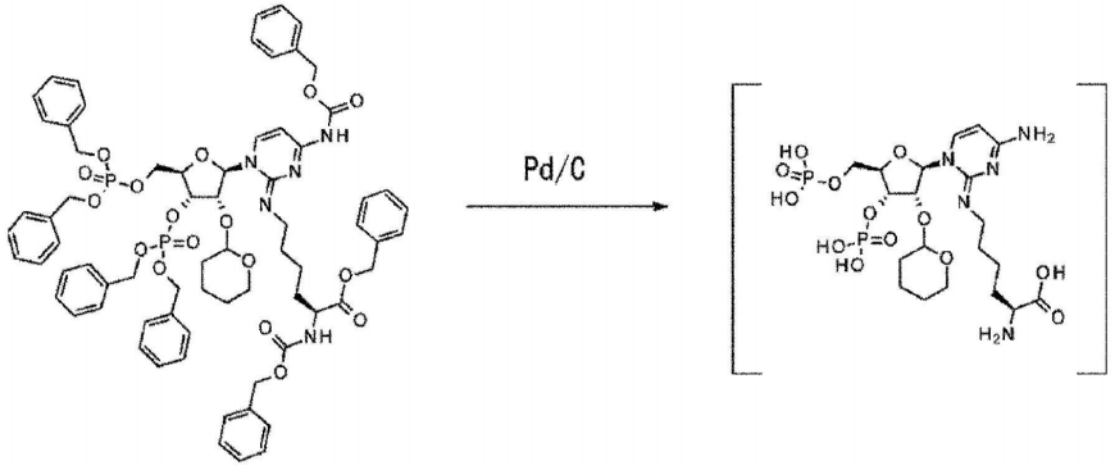
化合物SS30

[0597] 在氮气体氛围中,将(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4R,5R)-4-羟基-5-(羟基甲基)-3-四氢吡喃-2-基氧基-四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸苄基酯(化合物SS29)(21.51mg,0.026mmol)及1H-四唑(22.22mg,0.317mmol)于室温溶解于乙腈(1.06mL)中,加入二苄基N,N-二异丙基亚磷酰胺(53.2μl,0.159mmol)于室温搅拌1小时。加入戴斯-马丁氧化剂(135mg,0.317mmol)于室温搅拌15分钟后,将反应液利用反相硅胶柱色谱(10mM AA水溶液/10mM AA乙腈溶液)进行纯化,作为源自THP保护上的不对称碳的非对映体形式混合物定量地得到了(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4R,5R)-4-二苄氧基磷酰基氧基-5-(二苄氧基磷酰基氧基甲基)-3-四氢吡喃-2-基氧基-四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸苄基酯(化合物SS30)(36.59mg,2步)。

[0598] LCMS(ESI)m/z＝1332.8(M-H)-

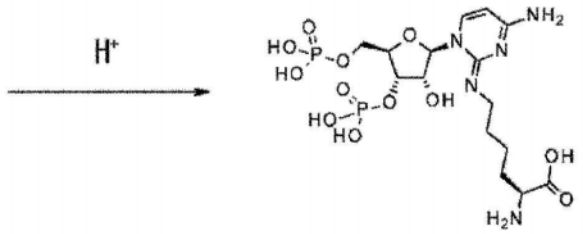
[0599] 保留时间:3.08分,3.11分钟(分析条件SQDAA50long)

[0600] (2S)-2-氨基-6-[[4-氨基-1-[(2R,3R,4S,5R)-3-羟基-4-磷酰氧基-54磷酰氧基甲基)四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸(化合物SS04,pLp)的合成



[0601]

化合物SS30



化合物SS04

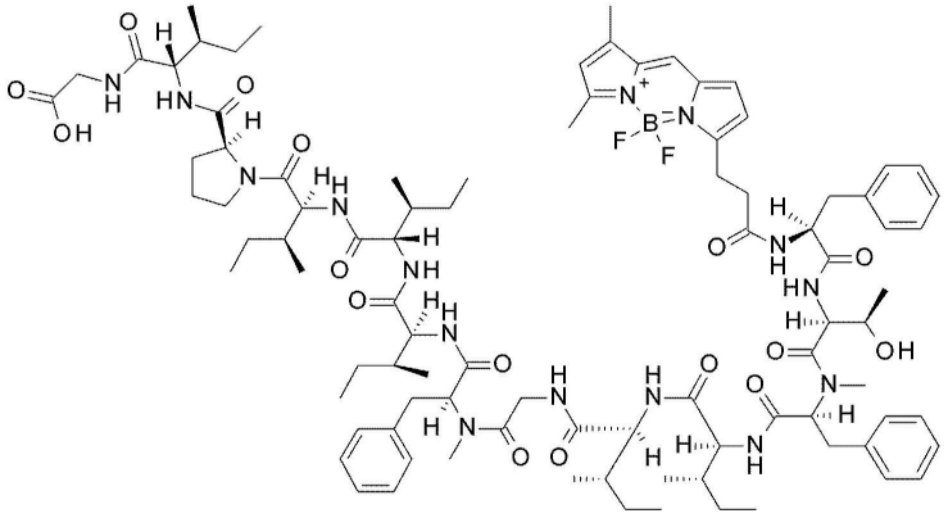
[0602] 将(2S)-2-(苄氧基羰基氨基)-6-[[4-(苄氧基羰基氨基)-1-[(2R,3R,4R,5R)-4-二苄氧基磷酰基氧基-5-(二苄氧基磷酰基氧基甲基)-3-四氢吡喃-2-基氧基-四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸苄基酯(化合物SS30)(36.59mg,0.027mmol)于室温溶解于甲醇(649μL)和超纯水(152μL)的混合溶剂,于氮气体氛围中加入钯/碳(Pd 10%)(5.84mg,5.48μmol)。于氢气体氛围中于室温搅拌18小时。将反应液用硅藻土过滤,使用超纯水洗涤多次。向得到的滤液(24.66mL)加入1mol/L盐酸(2.74mL,2.74mmol),于室温静置1小时。将反应液用硅藻土过滤,使用超纯水洗涤多次。将滤液冷冻干燥后得到的粉体使用超纯水(1.52mL)再次溶解,进行离心,回收上清液,由此得到了(2S)-2-氨基-6-[[4-氨基-1-[(2R,3R,4S,5R)-3-羟基-4-磷酰氧基-5-(磷酰氧基甲基)四氢呋喃-2-基]嘧啶-2-亚基]氨基]己酸(化合物SS04,pLp)的水溶液(1.37mL,17.47mM,87%,2步)。

[0603] LCMS(ESI)m/z＝530.1(M-H)-

[0604] 保留时间:1.60分钟(分析条件LTQTEA/HFIP05_02)

[0605] 实施例3

[0606] 实施例3-1.在N末端具有BdpFL的肽(LCT-67)的合成

[0607] 

[0608] 使用负载有Fmoc-Gly-OH的2-氯三苯甲基树脂(100mg),作为Fmoc氨基酸使用Fmoc-Gly-OH,以专利文献(WO2018225864)所述的方法合成的Fmoc-Thr(THP)-OH(aa01),Fmoc-Ile-OH,Fmoc-Leu-OH,Fmoc-Phe-OH,Fmoc-MePhe-OH,Fmoc-Pro-OH,通过肽合成仪进行肽的延长(关于氨基酸的缩略词,本说明书中另行记载)。按照基于Fmoc法的肽合成法进行肽的延长(WO201310013282)。肽延长完毕之后,通过在肽合成仪上进行N末端的Fmoc基的去除后,利用DCM洗涤树脂。

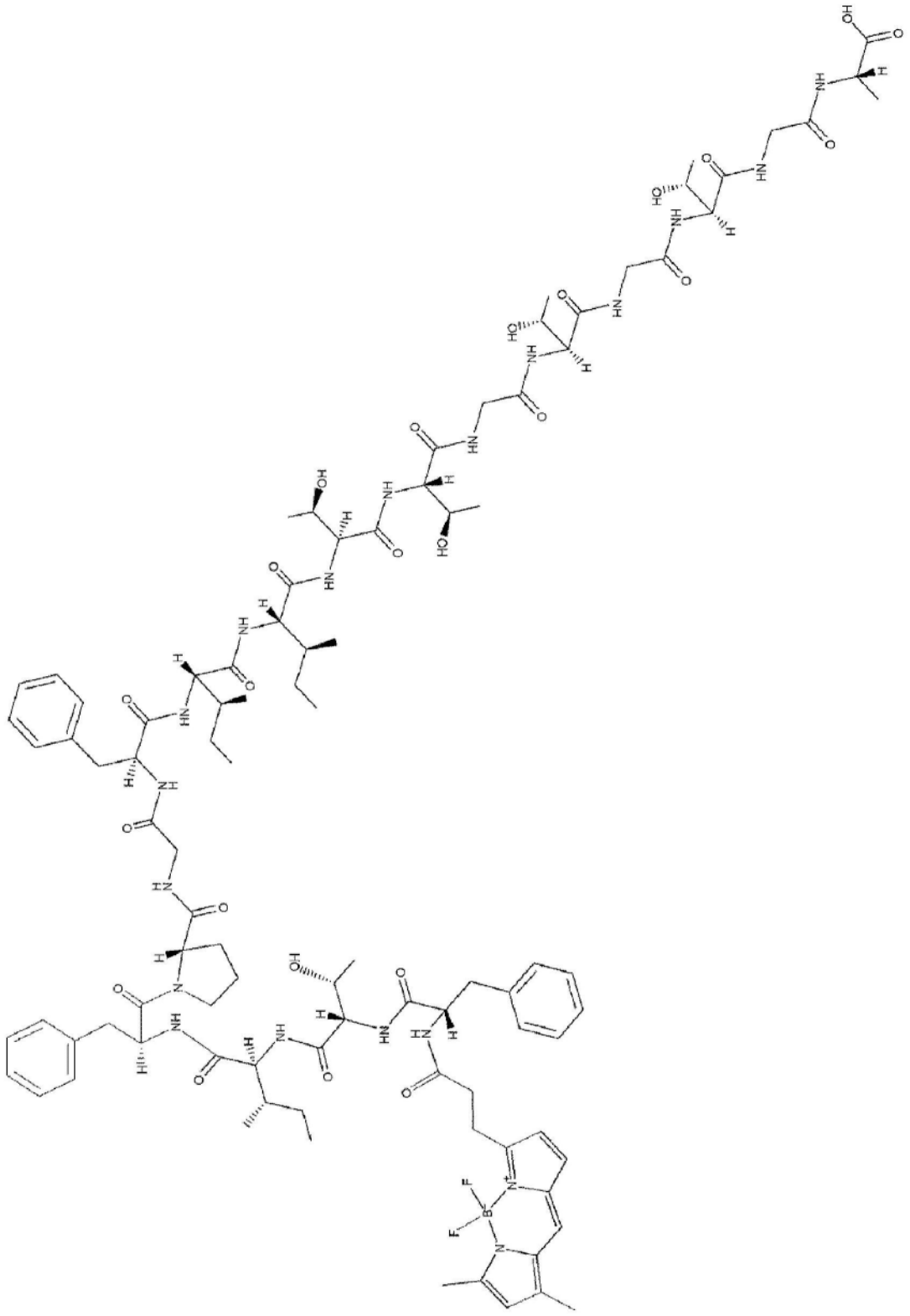
[0609] 在树脂中加入TFE/DCM(1:1,v/v,2mL)振荡1小时,进行从树脂切取肽。反应结束后,通过将管内的溶液利用合成用柱过滤而除去树脂,将树脂用TFE/DCM(1:1,v/v,1mL)洗涤2次。混合全部提取液,加入DMF(2mL)之后,进行减压浓缩。将得到的残渣溶解于NMP(1mL),于室温加入4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼杂-3a,4a-二氮杂-S-引达省-3-丙酸N-琥珀酰亚胺酯(5mg,0.013mmol),搅拌19小时之后,将反应液在反相硅胶柱色谱(0.1%FAMeCN/H2O)中通过,对包含中间体的级分进行减压浓缩。将得到的残渣溶解于DCM中的5%TFA(2mL),于室温搅拌2小时。将反应液减压浓缩之后,将得到的残渣利用反相硅胶柱色谱(0.1%FA MeCN/H2O)进行纯化,得到了标题化合物(LCT-67)(13mg)。LCT-67的氨基酸序列示于SEQ ID No:237。

[0610] LCMS(ESI)m/z=1751.2(M-H)-

[0611] 保留时间:0.97分钟(分析条件SQDFA05_02)

[0612] 实施例3-2N末端具有BdpFL的肽(LCT-12)的合成

[0613]



[0614] 使用负载有Fmoc-Ala-OH的2-氯三苯甲基树脂(100mg),作为Fmoc氨基酸使用Fmoc-Gly-OH,以专利文献(WO2018225864)所述的方法合成的Fmoc-Thr(THP)-OH(aa01),Fmoc-Ile-OH,Fmoc-Phe-OH,Fmoc-Pro-OH,通过肽合成仪进行肽的延长(关于氨基酸的缩略词,本说明书中另行记载)。按照基于Fmoc法的肽合成法进行肽的延长(WO2013100132B2)。肽延长完毕之后,通过在肽合成仪上进行N末端的Fmoc基的去除后,利用DCM洗涤树脂。

[0615] 在树脂中加入TFE/DCM(1:1,v/v,2mL)振荡1小时,进行从树脂切取肽。反应结束

后,通过将管内的溶液利用合成用柱过滤而除去树脂,将树脂用TFE/DCM(1:1,v/v,1mL)洗涤2次。混合全部提取液,加入DMF(2mL)之后,进行减压浓缩。将得到的残渣溶解于NMP(0.5mL),将其中的1/4(125μL)用于下个反应。在肽的NMP溶液中于室温加入制备为76.5mM的4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼杂-3a,4a-二氮杂-S-引达省-3-丙酸N-琥珀酰亚胺酯(140μL),于40℃过夜搅拌之后,进行减压浓缩。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),于室温搅拌2小时。将反应液利用反相硅胶柱色谱(0.1%FAMeCN/H2O)进行纯化,得到了标题化合物(LCT-12)(0.3mg)。将LCT-12的氨基酸序列示于SEQ ID No:238。

[0616] LCMS(ESI)m/z=1972,9(M-H)-

[0617] 保留时间:0.74分钟(分析条件SQDFA05_01)

[0618] 实施例4氨酰tRNA的合成

[0619] 实施例4-1 tRNA的制备

[0620] 由模板DNA(TD-1～TD-107),通过使用T7 RNA聚合酶的体外转录反应而合成tRNA(TR-1～TR-107),利用RNeasy试剂盒(Qiagen公司)纯化。

[0621] 模板DNA SEQ ID No:1(TD-1)

[0622] DNA序列:

[0623] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaagAAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0624] 模板DNA SEQ ID No:2(TD-2)

[0625] DNA序列:

[0626] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaagACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0627] 模板DNA SEQ ID No:3(TD-3)

[0628] DNA序列:

[0629] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaagAAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0630] 模板DNA SEQ ID No:4(TD-4)

[0631] DNA序列:

[0632] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaagACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0633] 模板DNA SEQ ID No:5(TD-5)

[0634] DNA序列:

[0635] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaagGAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0636] 模板DNA SEQ ID No:6(TD-6)

[0637] DNA序列:

[0638] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaagATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0639] 模板DNA SEQ ID No:7(TD-7)

[0640] DNA序列：

[0641] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaagGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0642] 模板DNA SEQ ID No:8(TD-8)

[0643] DNA序列：

[0644] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaagGAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0645] 模板DNA SEQ ID No:9(TD-9)

[0646] DNA序列：

[0647] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATaagGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0648] 模板DNA SEQ ID No:10(TD-10)

[0649] DNA序列：

[0650] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATaagATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0651] 模板DNA SEQ ID No:11(TD-11)

[0652] DNA序列：

[0653] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcagAAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0654] 模板DNA SEQ ID No:12(TD-12)

[0655] DNA序列：

[0656] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcagACGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0657] 模板DNA SEQ ID No:13(TD-13)

[0658] DNA序列：

[0659] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcagAAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0660] 模板DNA SEQ ID No:14(TD-14)

[0661] DNA序列：

[0662] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcagACGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0663] 模板DNA SEQ ID No:15(TD-15)

[0664] DNA序列：

[0665] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcagGAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0666] 模板DNA SEQ ID No:16(TD-16)

[0667] DNA序列：

[0668] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcagATGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0669] 模板DNA SEQ ID No:17(TD-17)

[0670] DNA序列：

[0671] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcagGTGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0672] 模板DNA SEQ ID No:18(TD-18)

[0673] DNA序列：

[0674] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcagGAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0675] 模板DNA SEQ ID No:19(TD-19)

[0676] DNA序列：

[0677] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATcagGTGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0678] 模板DNA SEQ ID No:20(TD-20)

[0679] DNA序列：

[0680] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATcagATGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0681] 模板DNA SEQ ID No:21(TD-21)

[0682] DNA序列：

[0683] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaggAAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0684] 模板DNA SEQ ID No:22(TD-22)

[0685] DNA序列：

[0686] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaggACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0687] 模板DNA SEQ ID No:23(TD-23)

[0688] DNA序列：

[0689] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaggAAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0690] 模板DNA SEQ ID No:24(TD-24)

[0691] DNA序列：

[0692] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaggACGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0693] 模板DNA SEQ ID No:25(TD-25)

[0694] DNA序列：

[0695] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaggGAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0696] 模板DNA SEQ ID No:26(TD-26)

[0697] DNA序列：

[0698] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaggATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0699] 模板DNA SEQ ID No:27(TD-27)

[0700] DNA序列：

[0701] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaggGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0702] 模板DNA SEQ ID No:28(TD-28)

[0703] DNA序列：

[0704] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaggGAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0705] 模板DNA SEQ ID No:29(TD-29)

[0706] DNA序列：

[0707] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATaggGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0708] 模板DNA SEQ ID No:30(TD-30)

[0709] DNA序列：

[0710] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATaggATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0711] 模板DNA SEQ ID No:31(TD-31)

[0712] DNA序列：

[0713] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcggAAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0714] 模板DNA SEQ ID No:32(TD-32)

[0715] DNA序列：

[0716] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcggACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0717] 模板DNA SEQ ID No:33(TD-33)

[0718] DNA序列：

[0719] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcggAAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0720] 模板DNA SEQ ID No:34(TD-34)

[0721] DNA序列：

[0722] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcggACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0723] 模板DNA SEQ ID No:35(TD-35)

[0724] DNA序列：

[0725] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcggGAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0726] 模板DNA SEQ ID No:36(TD-36)

[0727] DNA序列：

[0728] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcggATGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0729] 模板DNA SEQ ID No:37(TD-37)

[0730] DNA序列：

[0731] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcggGTGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0732] 模板DNA SEQ ID No:38(TD-38)

[0733] DNA序列：

[0734] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcggGAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0735] 模板DNA SEQ ID No:39(TD-39)

[0736] DNA序列：

[0737] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATcggGTGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0738] 模板DNA SEQ ID No:40(TD-40)

[0739] DNA序列：

[0740] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATcggATGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0741] 模板DNA SEQ ID No:41(TD-41)

[0742] DNA序列：

[0743] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaccAAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0744] 模板DNA SEQ ID No:42(TD-42)

[0745] DNA序列：

[0746] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaccACGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0747] 模板DNA SEQ ID No:43(TD-43)

[0748] DNA序列：

[0749] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaccAAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0750] 模板DNA SEQ ID No:44(TD-44)

[0751] DNA序列：

[0752] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaccACGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0753] 模板DNA SEQ ID No:45(TD-45)

[0754] DNA序列：

[0755] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTaccGAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0756] 模板DNA SEQ ID No:46(TD-46)

[0757] DNA序列：

[0758] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaccATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0759] 模板DNA SEQ ID No:47(TD-47)

[0760] DNA序列：

[0761] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaccGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0762] 模板DNA SEQ ID No:48(TD-48)

[0763] DNA序列：

[0764] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTaccGAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0765] 模板DNA SEQ ID No:49(TD-49)

[0766] DNA序列：

[0767] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATaccGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0768] 模板DNA SEQ ID No:50(TD-50)

[0769] DNA序列：

[0770] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATaccATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0771] 模板DNA SEQ ID No:51(TD-51)

[0772] DNA序列：

[0773] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcccAAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0774] 模板DNA SEQ ID No:52(TD-52)

[0775] DNA序列：

[0776] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcccACGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0777] 模板DNA SEQ ID No:53(TD-53)

[0778] DNA序列：

[0779] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcccAAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0780] 模板DNA SEQ ID No:54(TD-54)

[0781] DNA序列：

[0782] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcccACGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0783] 模板DNA SEQ ID No:55(TD-55)

[0784] DNA序列：

[0785] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTcccGAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0786] 模板DNA SEQ ID No:56(TD-56)

[0787] DNA序列：

[0788] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcccATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0789] 模板DNA SEQ ID No:57(TD-57)

[0790] DNA序列：

[0791] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcccGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0792] 模板DNA SEQ ID No:58(TD-58)

[0793] DNA序列：

[0794] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTcccGAGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0795] 模板DNA SEQ ID No:59(TD-59)

[0796] DNA序列：

[0797] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATcccGTGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0798] 模板DNA SEQ ID No:60(TD-60)

[0799] DNA序列：

[0800] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCATcccATGGCGGTAAC AGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0801] 模板DNA SEQ ID No:61(TD-61)

[0802] DNA序列：

[0803] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagAAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0804] 模板DNA SEQ ID No:62(TD-62)

[0805] DNA序列：

[0806] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagACGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0807] 模板DNA SEQ ID No:63(TD-63)

[0808] DNA序列：

[0809] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagAAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0810] 模板DNASEQ ID No:64(TD-64)

[0811] DNA序列：

[0812] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagACGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0813] 模板DNA SEQ ID No:65(TD-65)

[0814] DNA序列：

[0815] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagGAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0816] 模板DNA SEQ ID No:66(TD-66)

[0817] DNA序列：

[0818] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagATGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0819] 模板DNA SEQ ID No:67(TD-67)

[0820] DNA序列：

[0821] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagGTGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0822] 模板DNA SEQ ID No:68(TD-68)

[0823] DNA序列：

[0824] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagGAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0825] 模板DNA SEQ ID No:69(TD-69)

[0826] DNA序列：

[0827] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATaagGTGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0828] 模板DNA SEQ ID No:70(TD-70)

[0829] DNA序列：

[0830] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATaagATGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0831] 模板DNA SEQ ID No:71(TD-71)

[0832] DNA序列：

[0833] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagAAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0834] 模板DNA SEQ ID No:72(TD-72)

[0835] DNA序列：

[0836] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTcagACGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0837] 模板DNA SEQ ID No:73(TD-73)

[0838] DNA序列：

[0839] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTcagAAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0840] 模板DNA SEQ ID No:74(TD-74)

[0841] DNA序列：

[0842] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagACGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0843] 模板DNA SEQ ID No:75(TD-75)

[0844] DNA序列：

[0845] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagGAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0846] 模板DNA SEQ ID No:76(TD-76)

[0847] DNA序列：

[0848] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTcagATGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0849] 模板DNA SEQ ID No:77(TD-77)

[0850] DNA序列：

[0851] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTcagGTGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0852] 模板DNA SEQ ID No:78(TD-78)

[0853] DNA序列：

[0854] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTcagGAGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0855] 模板DNA SEQ ID No:79(TD-79)

[0856] DNA序列：

[0857] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATcagGTGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0858] 模板DNA SEQ ID No:80(TD-80)

[0859] DNA序列：

[0860] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATcagATGCAGGGGGT CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0861] 模板DNA SEQ ID No:81(TD-81)

[0862] DNA序列：

[0863] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTaagAATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0864] 模板DNA SEQ TD No:82(TD-82)

[0865] DNA序列：

[0866] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagACTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0867] 模板DNA SEQ ID No:83(TD-83)

[0868] DNA序列：

[0869] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagAATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0870] 模板DNA SEQ ID No:84(TD-84)

[0871] DNA序列：

[0872] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTaagACTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0873] 模板DNA SEQ ID No:85(TD-85)

[0874] DNA序列：

[0875] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTaagGATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0876] 模板DNA SEQ ID No:86(TD-86)

[0877] DNA序列：

[0878] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagATTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0879] 模板DNA SEQ ID No:87(TD-87)

[0880] DNA序列：

[0881] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagGTTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0882] 模板DNA SEQ ID No:88(TD-88)

[0883] DNA序列：

[0884] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagGATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0885] 模板DNA SEQ ID No:89(TD-89)

[0886] DNA序列：

[0887] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATaagGTTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0888] 模板DNA SEQ ID No:90(TD-90)

[0889] DNA序列：

[0890] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATaagATTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0891] 模板DNA SEQ ID No:91(TD-91)

[0892] DNA序列：

[0893] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTcagAATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0894] 模板DNA SEQ ID No:92(TD-92)

[0895] DNA序列：

[0896] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagACTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0897] 模板DNA SEQ ID No:93(TD-93)

[0898] DNA序列：

[0899] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagAATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0900] 模板DNA SEQ ID No:94(TD-94)

[0901] DNA序列：

[0902] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTcagACTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0903] 模板DNA SEQ ID No:95(TD-95)

[0904] DNA序列：

[0905] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTcagGATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0906] 模板DNA SEQ ID No:96(TD-96)

[0907] DNA序列：

[0908] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagATTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0909] 模板DNA SEQ ID No:97(TD-97)

[0910] DNA序列：

[0911] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagGTTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0912] 模板DNA SEQ ID No:98(TD-98)

[0913] DNA序列：

[0914] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagGATCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0915] 模板DNA SEQ ID No:99(TD-99)

[0916] DNA序列：

[0917] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATcagGTTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0918] 模板DNA SEQ ID No:100(TD-100)

[0919] DNA序列：

[0920] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATcagATTCCGTATGTC ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0921] 模板DNA SEQ ID No:101(TD-101)

[0922] DNA序列：

[0923] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTgccACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0924] 模板DNA SEQ ID No:102(TD-102)

[0925] DNA序列：

[0926] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTgccGTGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0927] 模板DNA SEQ ID No:103(TD-103)

[0928] DNA序列：

[0929] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCTTgccGAGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0930] 模板DNA SEQ ID No:104(TD-104)

[0931] DNA序列：

[0932] GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTtccACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGC

[0933] 模板DNA SEQ ID No:105(TD-105)

[0934] DNA序列：

[0935] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCGGGGTGGAGCAGCCTGGTAGCTCGTCGGGCTcatAACCCGAAGATCGTCGGTTCAAATCCGGCCCCCGCAAC

[0936] 模板DNA SEQ ID No:106(TD-106)

[0937] DNA序列：

[0938] GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTtagGTGCAGGGGGTCGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0939] 模板DNA SEQ ID No:107(TD-107)

[0940] DNA序列：

[0941] GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTtagGTTCCGTATGTCACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0942] tRNA SEQ ID No:108(TR-1)

[0943] tRNA(Glu2+Ser5)aag-CA RNA序列：

[0944] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0945] tRNA SEQ ID No:109(TR-2)

[0946] tRNA(Glu2+Ala1B)aag-CA RNA序列：

[0947] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaagACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0948] tRNA SEQ ID No:110(TR-3)

[0949] tRNA(Glu2+Phe)aag-CA RNA序列：

[0950] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaagAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0951] tRNA SEQ ID No:111(TR-4)

[0952] tRNA(Glu2)aag-CA RNA序列：

[0953] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0954] tRNA SEQ ID No:112(TR-5)

[0955] tRNA(Glu2+Arg3)aag-CA RNA序列：

[0956] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0957] tRNA SEQ ID No:113(TR-6)

[0958] tRNA(Glu2+Val2)aag-CA RNA序列：

[0959] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaagAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0960] tRNA SEQ ID No:114(TR-7)

[0961] tRNA(Glu2+Leu2)aag-CA RNA序列：

[0962] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaagGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0963] tRNA SEQ ID No:115(TR-8)

[0964] tRNA(Glu2+Pro3)aag-CA RNA序列：

[0965] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaagGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0966] tRNA SEQ ID No:116(TR-g)

[0967] tRNA(Glu2+Pro2)aag-CA RNA序列：

[0968] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaagGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0969] tRNA SEQ ID No:117(TR-10)

[0970] tRNA(Glu2+Ala2)aag-CA RNA序列：

[0971] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaagAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0972] tRNA SEQ ID No:118(TR-11)

[0973] tRNA(Glu2+Ser5)cag-CA RNA序列：

[0974] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcagAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[0975] tRNA SEQ ID No:119(TR-12)

[0976] tRNA(Glu2+Ala1B)cag-CA RNA序列：

[0977] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcagACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0978] tRNA SEQ ID No:120(TR-13)

[0979] tRNA(Glu2+Phe)cag-CA RNA序列：

[0980] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcagAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0981] tRNA SEQ ID No:121(TR-14)

[0982] tRNA(Glu2)cag-CA RNA序列：

[0983] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcagACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0984] tRNA SEQ ID No:122(TR-15)

[0985] tRNA(Glu2+Arg3)cag-CA RNA序列：

[0986] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcagGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0987] tRNA SEQ ID No:123(TR-16)

[0988] tRNA(Glu2+Val2)cag-CA RNA序列：

[0989] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcagAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0990] tRNA SEQ ID No:124(TR-17)

[0991] tRNA(Glu2+Leu2)cag-CA RNA序列：

[0992] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcagGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0993] tRNA SEQ ID No:125(TR-18)

[0994] tRNA(Glu2+Pro3)cag-CA RNA序列：

[0995] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcagGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0996] tRNA SEQ ID No:126(TR-19)

[0997] tRNA(Glu2+Pro2)cag-CA RNA序列：

[0998] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcagGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[0999] tRNA SEQ ID No:127(TR-20)

[1000] tRNA(Glu2+Ala2)cag-CA RNA序列：

[1001] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcagAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1002] tRNA SEQ ID No:128(TR-21)

[1003] tRNA(Glu2+Ser5)agg-CA RNA序列：

[1004] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaggAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1005] tRNA SEQ ID No:129(TR-22)

[1006] tRNA(Glu2+Ala1B)agg-CA RNA序列：

[1007] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaggACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1008] tRNA SEQ ID No:130(TR-23)

[1009] tRNA(Glu2+Phe)agg-CA RNA序列：

[1010] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaggAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1011] tRNA SE9 ID No:131(TR-24)

[1012] tRNA(Glu2)agg-CA RNA序列：

[1013] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaggACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1014] tRNA SEQ ID No:132(TR-25)

[1015] tRNA(Glu2+Arg3)agg-CA RNA序列：

[1016] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaggGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1017] tRNA SE9 ID No:133(TR-26)

[1018] tRNA(Glu2+Val2)agg-CA RNA序列：

[1019] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaggAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1020] tRNA SEQ ID No:134(TR-27)

[1021] tRNA(Glu2+Leu2)agg-CA RNA序列：

[1022] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaggGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1023] tRNA SEQ ID No:135(TR-28)

[1024] tRNA(Glu2+Pro3)agg-CA RNA序列：

[1025] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaggGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1026] tRNA SEQ ID No:136(TR-29)

[1027] tRNA(Glu2+Pro2)agg-CA RNA序列：

[1028] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaggGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1029] tRNA SEQ ID No:137(TR-30)

[1030] tRNA(Glu2+Ala2)agg-CA RNA序列：

[1031] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaggAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1032] tRNA SEQ ID No:138(TR-31)

[1033] tRNA(Glu2+Ser5)cgg-CA RNA序列：

[1034] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcggAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1035] tRNA SEQ ID No:139(TR-32)

[1036] tRNA(Glu2+Ala1B)cgg-CA RNA序列：

[1037] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1038] tRNA SEQ ID No:140(TR-33)

[1039] tRNA(Glu2+Phe)cgg-CA RNA序列：

[1040] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1041] tRNA SEQ ID No:141(TR-34)

[1042] tRNA(Glu2)cgg-CA RNA序列：

[1043] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcggACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1044] tRNA SEQ ID No:142(TR-35)

[1045] tRNA(Glu2+Arg3)cgg-CA RNA序列：

[1046] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcggGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1047] tRNA SEQ ID No:143(TR-36)

[1048] tRNA(Glu2+Val2)cgg-CA RNA序列：

[1049] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1050] tRNA SEQ ID No:144(TR-37)

[1051] tRNA(Glu2+Leu2)cgg-CA RNA序列：

[1052] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1053] tRNA SEQ ID No:145(TR-38)

[1054] tRNA(Glu2+Pro3)cgg-CA RNA序列：

[1055] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1056] tRNA SEQ ID No:146(TR-39)

[1057] tRNA(Glu2+Pro2)cgg-CA RNA序列：

[1058] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcggGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1059] tRNA SEQ ID No:147(TR-40)

[1060] tRNA(Glu2+Ala2)cgg-CA RNA序列：

[1061] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcggAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1062] tRNA SEQ ID No:148(TR-41)

[1063] tRNA(Glu2+Ser5)acc-CA RNA序列：

[1064] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaccAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1065] tRNA SEQ ID No:149(TR-42)

[1066] tRNA(Glu2+Ala1B)acc-CA RNA序列：

[1067] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1068] tRNA SEQ ID No:150(TR-43)

[1069] tRNA(Glu2+Phe)acc-CA RNA序列：

[1070] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1071] tRNA SEQ ID No:151(TR-44)

[1072] tRNA(Glu2)acc-CA RNA序列：

[1073] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaccACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1074] tRNA SEQ ID No:152(TR-45)

[1075] tRNA(Glu2+Arg3)acc-CA RNA序列：

[1076] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaccGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG GACGC

[1077] tRNA SEQ ID No:153(TR-46)

[1078] tRNA(Glu2+Val2)acc-CA RNA序列：

[1079] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1080] tRNA SEQ ID No:154(TR-47)

[1081] tRNA(Glu2+Leu2)acc-CA RNA序列：

[1082] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1083] tRNA SEQ ID No:155(TR-48)

[1084] tRNA(Glu2+Pro3)acc-CA RNA序列：

[1085] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1086] tRNA SEQ ID No:156(TR-49)

[1087] tRNA(Glu2+Pro2)acc-CA RNA序列：

[1088] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaccGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1089] tRNA SEQ ID No:157(TR-50)

[1090] tRNA(Glu2+Ala2)acc-CA RNA序列：

[1091] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaccAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1092] tRNA SEQ ID No:158(TR-51)

[1093] tRNA(Glu2+Ser5)ccc-CA RNA序列：

[1094] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcccAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1095] tRNA SEQ ID No:159(TR-52)

[1096] tRNA(Glu2+Ala1B)ccc-CA RNA序列：

[1097] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcccACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1098] tRNA SEQ ID No:160(TR-53)

[1099] tRNA(Glu2+Phe)ccc-CA RNA序列：

[1100] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcccAAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1101] tRNA SEQ ID No:161(TR-54)

[1102] tRNA(Glu2)ccc-CA RNA序列：

[1103] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcccACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1104] tRNA SEQ ID No:162(TR-55)

[1105] tRNA(Glu2+Arg3)ccc-CA RNA序列：

[1106] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcccGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1107] tRNA SEQ ID No:163(TR-56)

[1108] tRNA(Glu2+Val2)ccc-CA RNA序列：

[1109] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcccAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1110] tRNA SEQ ID No:164(TR-57)

[1111] tRNA(Glu2+Leu2)ccc-CA RNA序列：

[1112] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcccGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1113] tRNA SEQ ID No:165(TR-58)

[1114] tRNA(Glu2+Pro3)ccc-CA RNA序列：

[1115] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcccGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1116] tRNA SEQ ID No:166(TR-59)

[1117] tRNA(Glu2+Pro2)ccc-CA RNA序列：

[1118] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcccGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1119] tRNA SEQ ID No:167(TR-60)

[1120] tRNA(Glu2+Ala2)ccc-CA RNA序列：

[1121] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcccAUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1122] tRNA SEQ ID No:168(TR-61)

[1123] tRNA(Asp1+Ser5)aag-CA RNA序列：

[1124] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUaagAAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1125] tRNA SEQ ID No:169(TR-62)

[1126] tRNA(Asp1+Ala1B)aag-CA RNA序列：

[1127] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUaagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1128] tRNA SEQ ID No:170(TR-63)

[1129] tRNA(Asp1+Phe)aag-CA RNA序列：

[1130] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUaagAAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1131] tRNA SEQ ID No:171(TR-64)

[1132] tRNA(Asp1)aag-CA RNA序列:

[1133] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUaagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1134] tRNA SEQ ID No:172(TR-65)

[1135] tRNA(Asp1+Arg3)aag-CA RNA序列:

[1136] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUaagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1137] tRNA SEQ ID No:173(TR-66)

[1138] tRNA(Asp1+Val2)aag-CA RNA序列:

[1139] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUaagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1140] tRNA SEQ ID No:174(TR-67)

[1141] tRNA(Asp1+Leu2)aag-CA RNA序列:

[1142] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUaagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1143] tRNA SEQ ID No:175(TR-68)

[1144] tRNA(Asp1+Pro3)aag-CA RNA序列:

[1145] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUaagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1146] tRNA SEQ ID No:176(TR-69)

[1147] tRNA(Asp1+Pro2)aag-CA RNA序列:

[1148] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCAUaagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1149] tRNA SEQ ID No:177(TR-70)

[1150] tRNA(Asp1+Ala2)aag-CA RNA序列:

[1151] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCAUaagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1152] tRNA SEQ ID No:178(TR-71)

[1153] tRNA(Asp1+Ser5)cag-CA RNA序列:

[1154] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUcagAAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1155] tRNA SEQ ID No:179(TR-72)

[1156] tRNA(Asp1+Ala1B)cag-CA RNA序列:

[1157] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUcagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1158] tRNA SEQ ID No:180(TR-73)

[1159] tRNA(Asp1+Ph2)cag-CA RNA序列：

[1160] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUcagAAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1161] tRNA SEQ ID No:181(TR-74)

[1162] tRNA(Asp1)cag-CA RNA序列：

[1163] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUcagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1164] tRNA SEQ ID No:182(TR-75)

[1165] tRNA(Asp1+Arg3)cag-CA RNA序列：

[1166] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUcagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1167] tRNA SEQ ID No:183(TR-76)

[1168] tRNA(Asp1+Val2)cag-CA RNA序列：

[1169] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUcagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1170] tRNA SEQ ID No:184(TR-77)

[1171] tRNA(Asp1+Leu2)cag-CA RNA序列：

[1172] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUcagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1173] tRNA SEQ ID No:185(TR-78)

[1174] tRNA(Asp1+Pro3)cag-CA RNA序列：

[1175] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUcagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1176] tRNA SEQ ID No:186(TR-79)

[1177] tRNA(Asp1+Pro2)cag-CA RNA序列：

[1178] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCAUcagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1179] tRNA SEQ TD No:187(TR-80)

[1180] tRNA(Asp1+Ala2)cag-CA RNA序列：

[1181] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCAUcagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1182] tRNA SEQ ID No:188(TR-81)

[1183] tRNA(AsnE2)aag-CA RNA序列：

[1184] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUaagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1185] tRNA SEQ ID No:189(TR-82)

[1186] tRNA(AsnE2+Ala1B)aag-CA RNA序列：

[1187] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1188] tRNA SEQ ID No:190(TR-83)

[1189] tRNA(AsnE2+Phe)aag-CA RNA序列：

[1190] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1191] tRNA SEQ ID No:191(TR-84)

[1192] tRNA(AsnE2+Glu2)aag-CA RNA序列：

[1193] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUaagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1194] tRNA SEQ ID No:192(TR-85)

[1195] tRNA(AsnE2+Arg3)aag-CA RNA序列：

[1196] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUaagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1197] tRNA SEQ ID No:193(TR-86)

[1198] tRNA(AsnE2+Val2)aag-CA RNA序列：

[1199] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1200] tRNA SEQ ID No:194(TR-87)

[1201] tRNA(AsnE2+Leu2)aag-CA RNA序列：

[1202] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1203] tRNA SEQ ID No:195(TR-88)

[1204] tRNA(AsnE2+Pro3)aag-CA RNA序列：

[1205] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1206] tRNA SEQ ID No:196(TR-89)

[1207] tRNA(AsnE2+Pro2)aag-CA RNA序列：

[1208] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAAUaagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1209] tRNA SEQ ID No:197(TR-90)

[1210] tRNA(AsnE2+Ala2)aag-CA RNA序列：

[1211] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAAUaagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1212] tRNA SEQ ID No:198(TR-91)

[1213] tRNA(AsnE2)cag-CA RNA序列：

[1214] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUcagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1215] tRNA SEQ ID No:199(TR-92)

[1216] tRNA(AsnE2+Ala1B)cag-CA RNA序列：

[1217] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUcagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1218] tRNA SEQ ID No:200(TR-93)

[1219] tRNA(AsnE2+Phe)cag-CA RNA序列：

[1220] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUcagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1221] tRNA SEQ ID No:201(TR-94)

[1222] tRNA(AsnE2+Glu2)cag-CA RNA序列：

[1223] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUcagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1224] tRNA SEQ ID No:202(TR-95)

[1225] tRNA(AsnE2+Arg3)cag-CA RNA序列：

[1226] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUcagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1227] tRNA SEQ ID No:203(TR-96)

[1228] tRNA(AsnE2+Val2)cag-CA RNA序列：

[1229] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUcagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1230] tRNA SEQ ID No:204(TR-97)

[1231] tRNA(AsnE2+Leu2)cag-CA RNA序列：

[1232] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUcagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1233] tRNA SEQ ID No:205(TR-98)

[1234] tRNA(AsnE2+Pro3)cag-CA RNA序列：

[1235] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUcagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1236] tRNA SEQ ID No:206(TR-99)

[1237] tRNA(AsnE2+Pro2)cag-CA RNA序列：

[1238] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAAUcagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1239] tRNA SEQ ID No:207(TR-100)

[1240] tRNA(AsnE2+Ala2)cag-CA RNA序列：

[1241] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAAUcagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1242] tRNA SEQ ID No:208(TR-101)

[1243] tRNA(Glu2)gcc-CA RNA序列：

[1244] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUgccACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1245] tRNA SEQ ID No:209(TR-102)

[1246] tRNA(Glu2+Leu2)gcc-CA RNA序列：

[1247] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUgccGUGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1248] tRNA SEQ ID No:210(TR-103)

[1249] tRNA(Glu2+Pro3)gcc-CA RNA序列：

[1250] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUgccGAGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1251] tRNA SEQ ID No:211(TR-104)

[1252] tRNA(Glu2)ucc-CA RNA序列：

[1253] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUuccACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC

[1254] tRNA SEQ ID No:212(TR-105)

[1255] tRNA(fMet)cau-CA RNA序列：

[1256] GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUcauAACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC

[1257] tRNA SEQ ID No:213(TR-106)

[1258] tRNA(Asp1+Leu2)_uag-CA RNA序列：

[1259] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUuagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1260] tRNA SEQ ID No:214(TR-107)

[1261] tRNA(AsnE2+Leu2)_uag-CA RNA序列：

[1262] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUuagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1263] 实施例4-2基于连接反应的tRNA-CA的制作

[1264] 将tRNA5′片段,pLp,及tRNA3′片段通过以下记载的顺序使用连接反应进行连接,由此制备了各种tRNA-CA。tRNA5′片段及tRNA3′片段使用了化学合成品(Genedesign株式会社)。将各tRNA片段及全长的序列示于以下。需要说明的是,分别地,用于TR-108的制备使用了FR-1及FR-2,用于TR-109的制备使用了FR-3及FR-4作为tRNA5′片段及tRNA3′片段。

[1265] SEQ ID No:217(FR-1)

[1266] tRNA(Asp1)5’RNA序列

[1267] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUU

[1268] SEQ ID No:218(FR-2)

[1269] tRNA(Asp1)3’ag RNA序列

[1270] AGGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1271] tRNA SEQ ID No:215(TR-108)

[1272] tRNA(Asp1+Leu2)Lag-CA RNA序列：

[1273] GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUULagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

[1274] SEQ ID No:219(FR-3)

[1275] tRNA(AsnE2)5’RNA序列

[1276] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUU

[1277] SEQ ID No:220(FR-4)

[1278] tRNA(AsnE2)3’ag RNA序列

[1279] AGGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1280] tRNA SEQ ID No:216(TR-109)

[1281] tRNA(AsnE2+Leu2)Lag-CA RNA序列

[1282] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUULagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[1283] 将为50mM HEPES-KOH(pH 7.5),20mM $MgCl_2$,1mM ATP,0.125～0.25mM pLp,25μM tRNA5′片段,0.6U/μL T4 RNA连接酶(New England Biolabs),10％DMSO的组成的反应溶液于15℃过夜静置,由此进行了tRNA片段5′和pLp的连接反应。将连接产物进行苯酚-氯仿提取,通过乙醇沉淀回收。

[1284] 为了使未反应的tRNA5′片段不被留到下个连接反应,因此,通过过碘酸钠($NaIO_4$)使tRNA5′片段的3′末端的核糖开裂。具体而言通过将10μM连接产物,在10mM过碘酸钠存在下,在冰上,暗处静置30分钟而进行开裂反应。反应后,通过以1/10体积量加入100mM葡萄糖,在冰上,暗处静置30分钟分解过量的过碘酸钠。通过乙醇沉淀回收反应产物。

[1285] 为了将过碘酸处理后的连接产物的5′末端磷酸化,3′末端脱磷酸化,进行了T4

PNK(T4多聚核苷酸激酶)处理。通过将为10μM的过碘酸处理后的连接产物,50mM Tris-HCl(pH 8.0),10mM $MgCl_2$,5mM DTT,300μM ATP,0.5U/μL T4 PNK(TaKaRa)的组成的反应溶液于37℃静置30分～60分钟进行反应。进行苯酚-氯仿提取,通过乙醇沉淀回收反应产物。

[1286] 进行PNK处理后的反应产物与tRNA3′片段的连接反应。首先,将为10μM的PNK处理后的反应产物,10μM tRNA3′片段,50mM HEPES-KOH(pH 7.5),15mM $MgCl_2$的组成的溶液于65℃加热7分钟之后,于室温静置30分钟～1小时,由此进行PNK处理后的反应产物与tRNA3′片段的退火。接着,为了将tRNA3′片段的5′末端磷酸化而进行T4 PNK处理。T4 PNK处理通过在进行了退火的溶液中加入DTT(终浓度3.5mM),ATP(终浓度300μM),T4 PNK(终浓度0.5U/μL),于37℃静置30分钟而进行。接下来,通过向该溶液加入T4 RNA连接酶(New England Biolabs),使得终浓度为0.9U/μL,于37℃静置30分钟～40分钟而进行连接反应。将连接产物进行苯酚-氯仿提取,通过乙醇沉淀回收。

[1287] 通过连接法制作的tRNA-CA在利用高速反相色谱(HPLC)(15mM TEA和400mM HFIP的水溶液/15mM TEA和400mM HFIP的甲醇溶液)进行区分获取纯化后,通过改性尿素10％聚丙烯酰胺电泳确认了具有目标长度。

[1288] 被RNaseT1切割的tRNA片段的分析

[1289] 通过将利用连接反应制备的tRNA-CA利用RNase片段化而分析,由此确认用pLp导入的赖胞苷(L)被导入了目标部位。

[1290] 将含有10μM tRNA-CA,5U/μL RNaseT1(Epicentre或ThermoFisher Scientific),10mM乙酸铵(pH 5.3)的反应溶液于37℃静置1小时,由此将RNA在G碱基的3′侧特异性切割,分析包含用pLp导入的赖胞苷(L)的RNA片段。

[1291] CUULAGp

[1292] LCMS(ESI)m/z＝＝1020((间2H)/2)-

[1293] 保留时间:3.84分钟(分析条件LTQTEA/HFIP05_03)

[1294] 由于在pLp没有被连接的情况下假设的片段(CUUAGp)和源自RNA其它部分片段(UUCAGp)的分子量相等,因此,也一并进行了对没有片段化的状态的RNA(TR-108)的分析。

[1295] LCMS(ESI)m/z＝1109((间22H)/22)-

[1296] 保留时间:3.92分钟(分析条件LTQTEA/HFIP05_01)

[1297] 将在pLp没有被连接的情况下假设的RNA,及取代赖胞苷而进入了尿苷的情况下假设的RNA的质谱图进行比较,确认了已进行了大部分pLp的连接。

[1298] AUULAGp

[1299] LCMS(ESI)m/z＝1032((间2H)/2)-

[1300] 保留时间:4.16分钟(分析条件LTQTEA/HFIP05_03)

[1301] 将在pLp没有被连接的情况下假设的片段(AUUAGp)及取代赖胞苷而进入了尿苷的情况下假设的片段(AUUUAGp)的质谱图进行比较,确认了已进行了大部分pLp的连接。

[1302] 使用氨酰pCpA的延长氨酰tRNA的制备

[1303] 用无核酸酶水制备混合的反应液,使得为25μM转录tRNA(Glu2+Ser5)aag-CA(TR-1),50mM HEPES-KOH pH 7.5,20mM $MgCl_2$,1mM ATP,0.6Unit/μL T4 RNA连接酶(New England bio lab公司),0.25mM氨酰pCpA(SS15的DMSO溶液),于15℃进行了连接反应45分钟。将加入T4 RNA连接酶及氨酰pCpA前的反应液于95℃加热2分钟之后,于室温放置5分钟,

预先进行tRNA的再折叠。

[1304] 向连接反应液加入乙酸钠使得为0.3M，进行苯酚-氯仿提取，制备了延长氨酰tRNA(AAtR-1)。通过乙醇沉淀回收AAtR-1，在添加到翻译混合物中前将AAtR-1溶解于1mM乙酸钠水溶液。

[1305] 同样地，对于转录tRNA(TR-2～TR-103，TR-106～TR-109)，将氨酰pCpA(SS15)以上述的方法进行连接反应，苯酚-氯仿提取，乙醇沉淀，制备了延长氨酰tRNA(AAtR-2～AAtR-103，AAtR-132，AAtR-133，AAtR-136，AAtR-137)。将这些氨酰tRNA在添加到翻译混合物中前溶解于1mM乙酸钠水溶液。

[1306] 同样地，对于转录tRNA(TR-4，TR-14，TR-24，TR-34，TR-44，TR-54，TR-64，TR-74，TR-81，TR-91，TR-104)，将氨酰pCpA(SS16)以上述方法进行连接反应，苯酚-氯仿提取，乙醇沉淀，制备了延长氨酰tRNA(AAtR-104～AAtR-114)。将这些氨酰tRNA在添加到翻译混合物中前溶解于1mM乙酸钠水溶液。

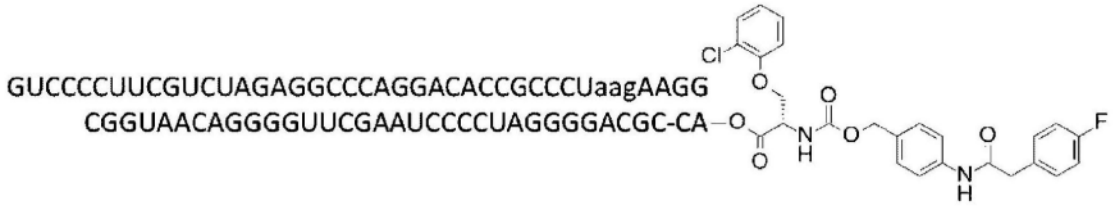
[1307] 同样地，对于转录tRNA(TR-44，TR-47，TR-48，TR-50)，将氨酰pCpA(SS14)以上述方法进行连接反应，苯酚-氯仿提取，乙醇沉淀，制备了延长氨酰tRNA(AAtR-115～AAtR-118)。将这些氨酰tRNA在添加到翻译混合物中前溶解于1mM乙酸钠水溶液。

[1308] 同样地，对于转录tRNA(TR-44，TR-47，TR-48，TR-50，TR-24，TR-34)，将氨酰pCpA(SS45)以上述方法进行连接反应，苯酚-氯仿提取，乙醇沉淀，制备了延长氨酰tRNA(AAtR-119～AAtR-122，AAtR-129，AAtR-130)。将这些氨酰tRNA在添加到翻译混合物中前溶解于1mM乙酸钠水溶液。

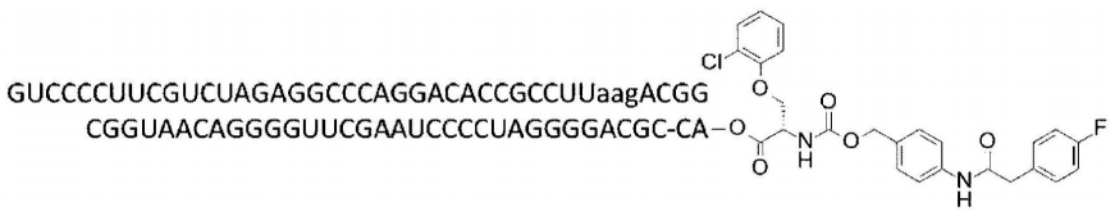
[1309] 同样地，对于转录tRNA(TR-44，TR-47，TR-48，TR-50，TR-77，TR-97)，将氨酰pCpA(专利文献(WO2018143145A1)所述的方法合成的化合物TS24)以上述方法进行连接反应，苯酚-氯仿提取，乙醇沉淀，制备了延长氨酰tRNA(AAtR-123～AAtR-126，AAtR-134，AAtR-138)。将这些氨酰tRNA在添加到翻译混合物中前溶解于1mM乙酸钠水溶液。

[1310] 同样地，对于转录tRNA(TR-54，TR-67，TR-87)，将氨酰pCpA(专利文献(WO2018143145A1)所述的方法合成的化合物ts14)以上述方法进行连接反应，苯酚-氯仿提取，乙醇沉淀，制备了延长氨酰tRNA(AAtR-127，AAtR-131，AAtR-135)。将该氨酰tRNA氨酰tRNA在添加到翻译混合物中前溶解于1mM乙酸钠水溶液。

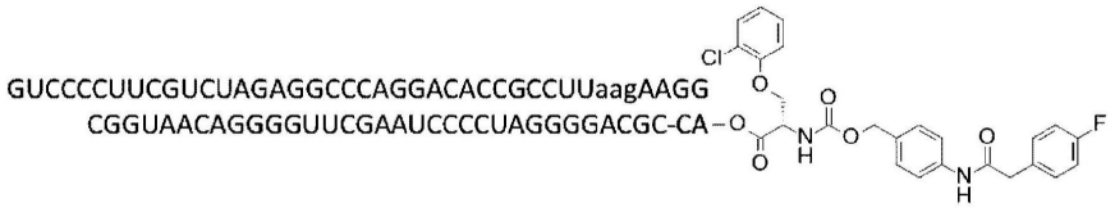
[1311] AAtR-1 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)aag

[1312] 

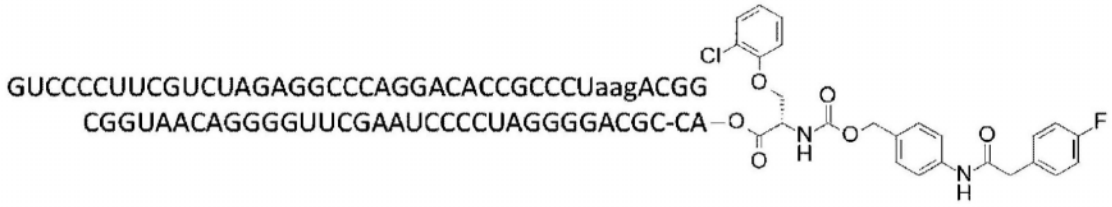
[1313] AAtR-2 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)aag

[1314] 

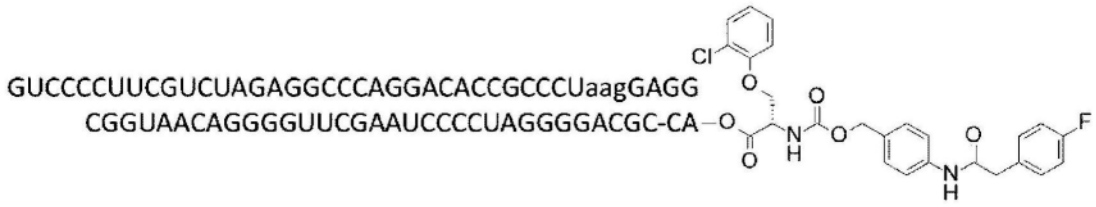
[1315] AAtR-3 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)aag

[1316] 

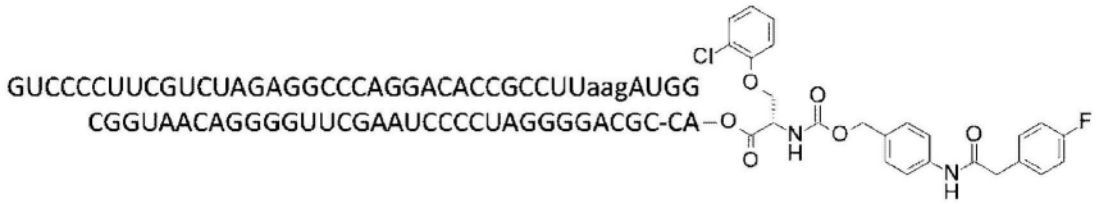
[1317] AAtR-4 SPh2Cl-tRNA(Glu2)aag

[1318] 

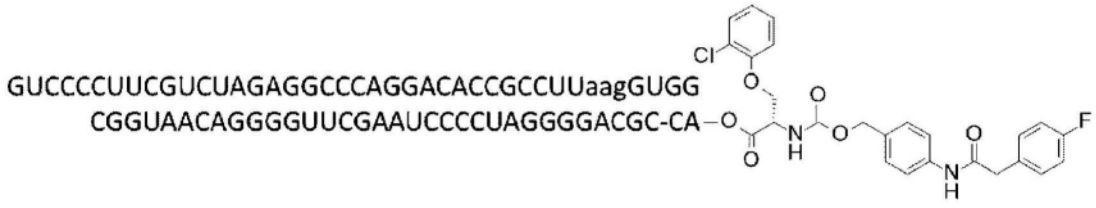
[1319] AAtR-5 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)aag

[1320] 

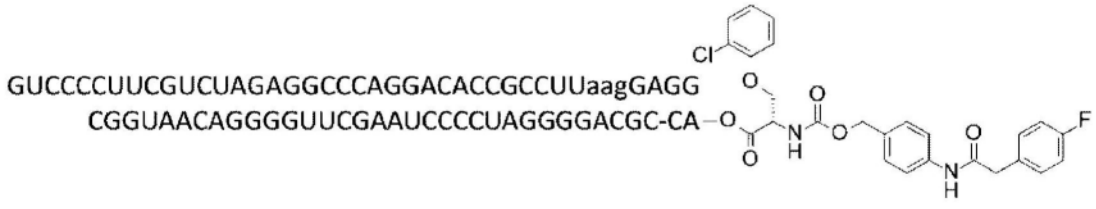
[1321] AAtR-6 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)aag

[1322] 

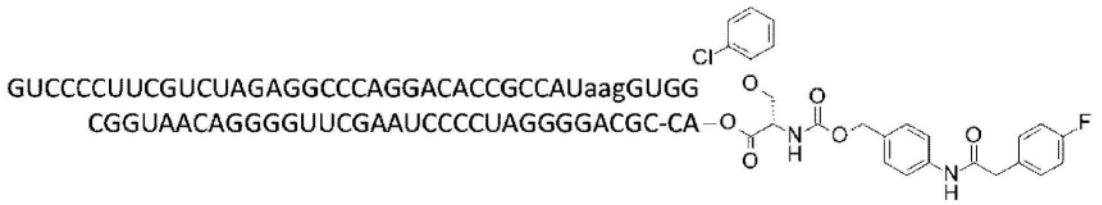
[1323] AAtR-7 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)aag

[1324] 

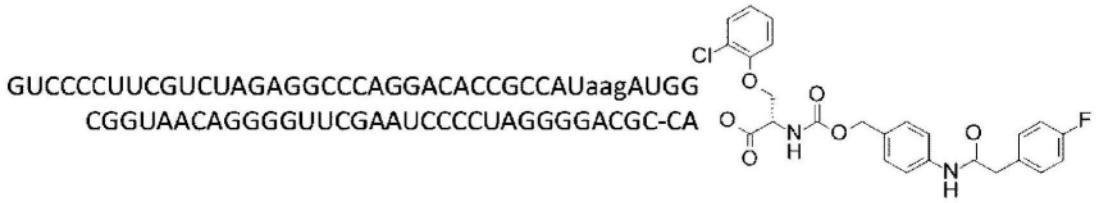
[1325] AAtR-8 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)aag

[1326] 

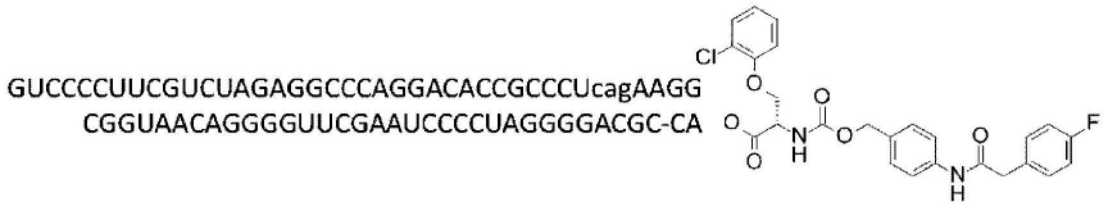
[1327] AAtR-9 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)aag

[1328] 

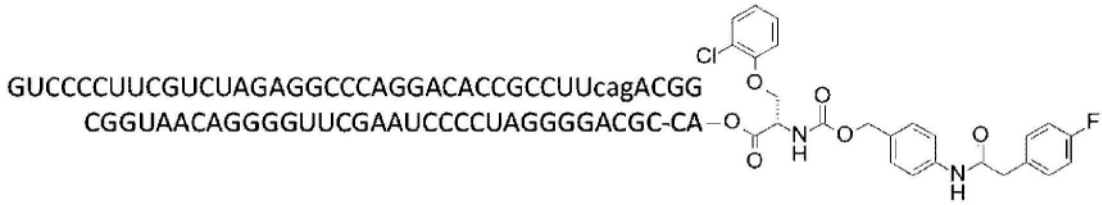
[1329] AAtR-10 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)aag

[1330] 

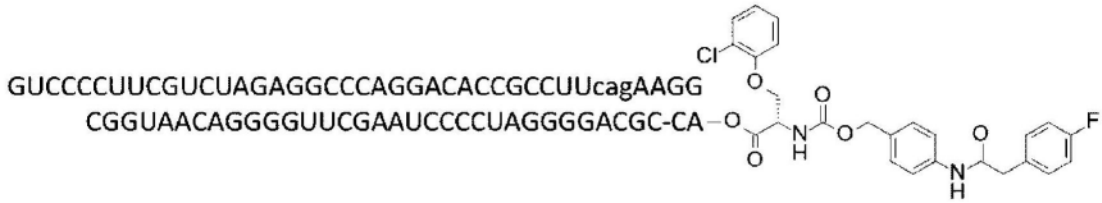
[1331] AAtR-11 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)cag

[1332] 

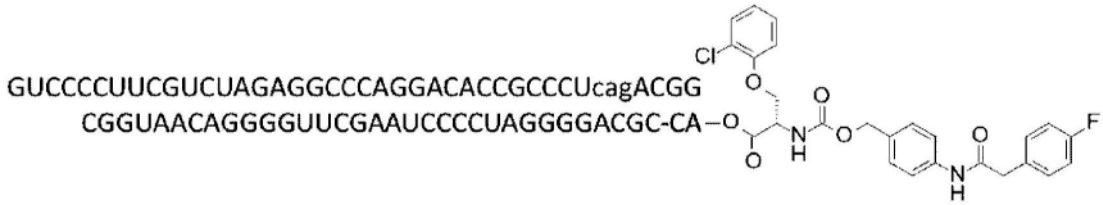
[1333] AAtR-12 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)cag

[1334] 

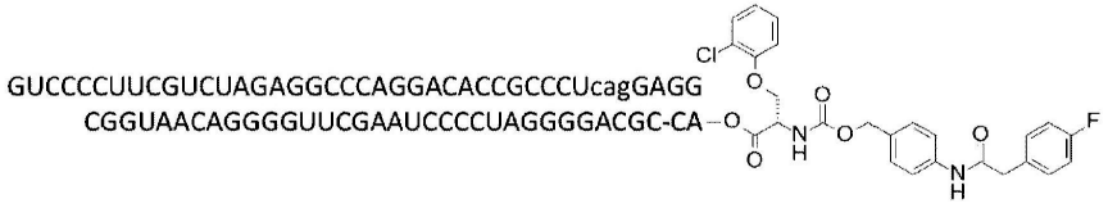
[1335] AAtR-13 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)cag

[1336] 

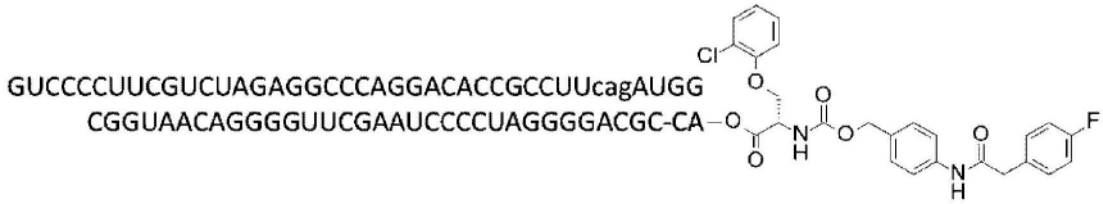
[1337] AAtR-14 SPh2Cl-tRNA(Glu2)cag

[1338] 

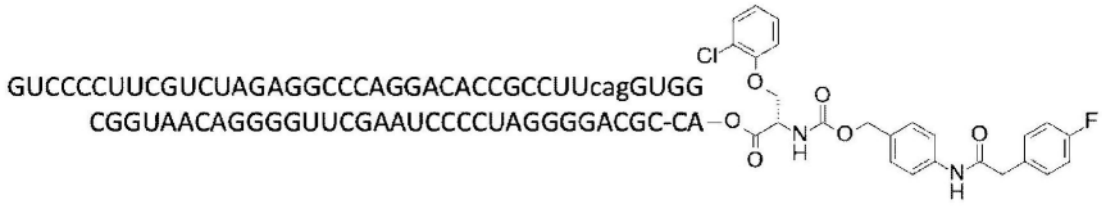
[1339] AAtR-15 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)cag

[1340] 

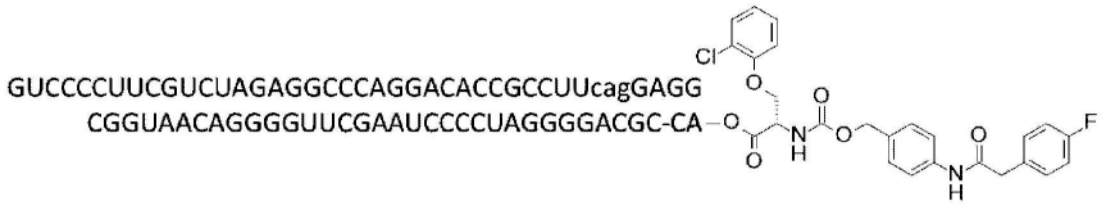
[1341] AAtR-16 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)cag

[1342] 

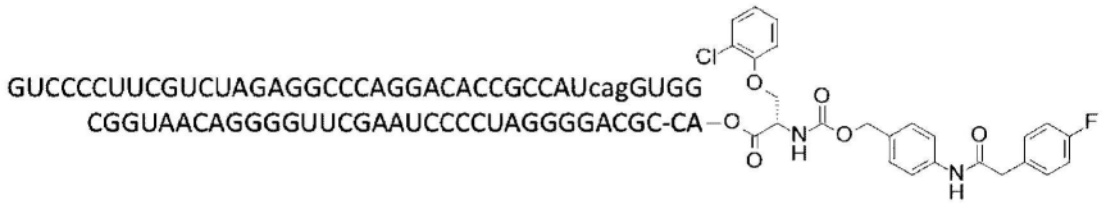
[1343] AAtR-17 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)cag

[1344] 

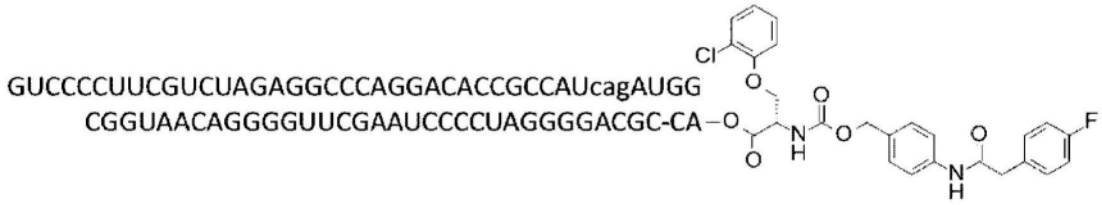
[1345] AAtR-18 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)cag

[1346] 

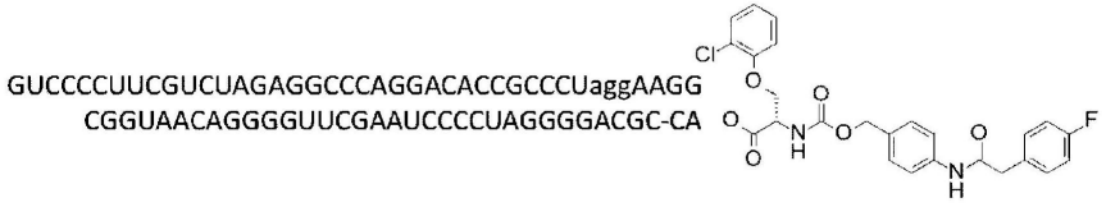
[1347] AAtR-19 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)cag

[1348] 

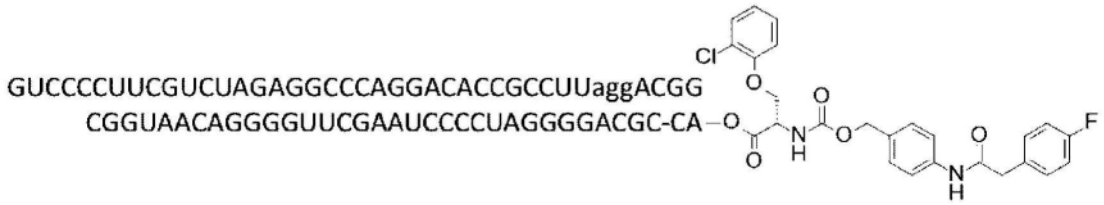
[1349] AAtR-20 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)cag

[1350] 

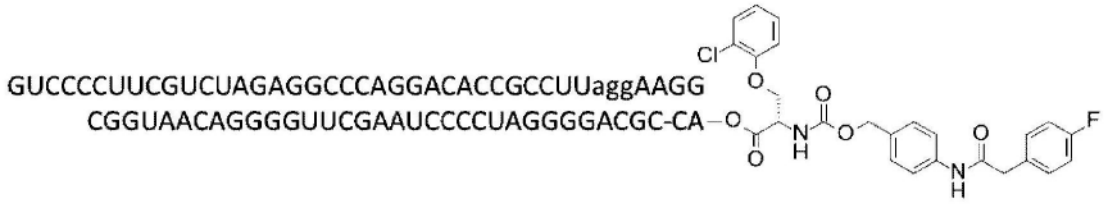
[1351] AAtR-21 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)agg

[1352] 

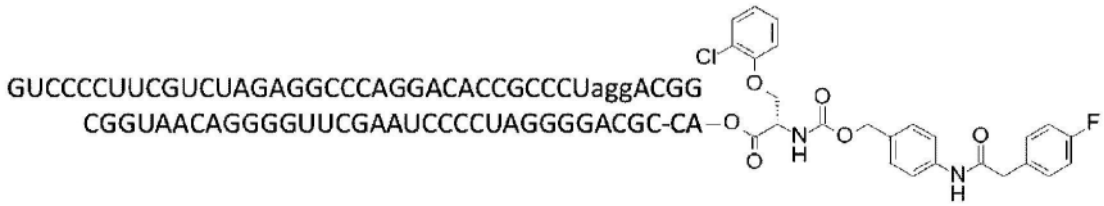
[1353] AAtR-22 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)agg

[1354] 

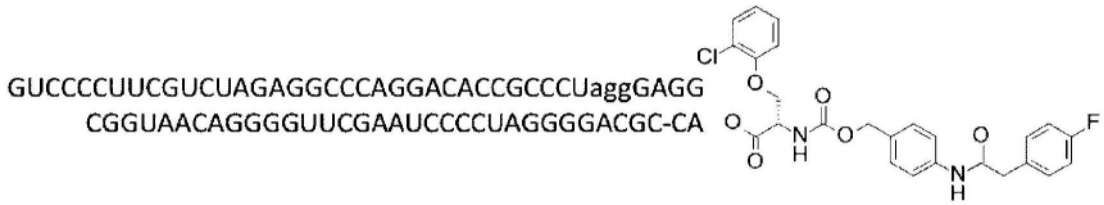
[1355] AAtR-23 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)agg

[1356] 

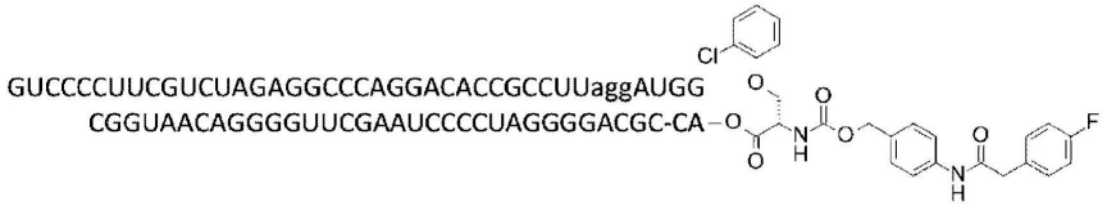
[1357] AAtR-24 SPh2Cl-tRNA(Glu2)agg

[1358] 

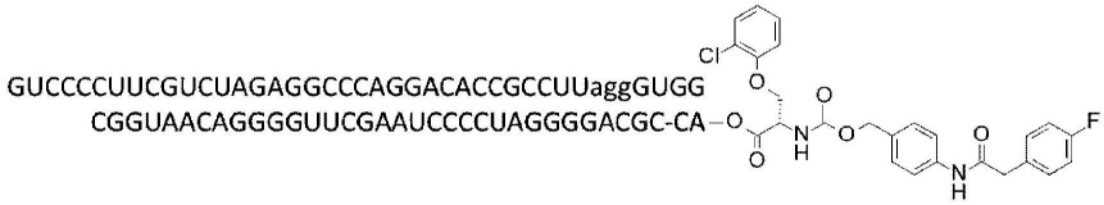
[1359] AAtR-25 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)agg

[1360] 

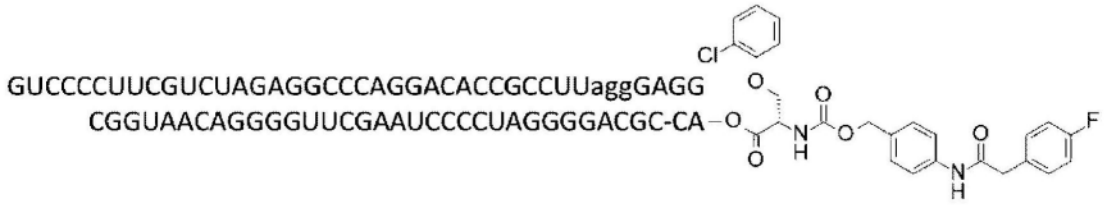
[1361] AAtR-26 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)agg

[1362] 

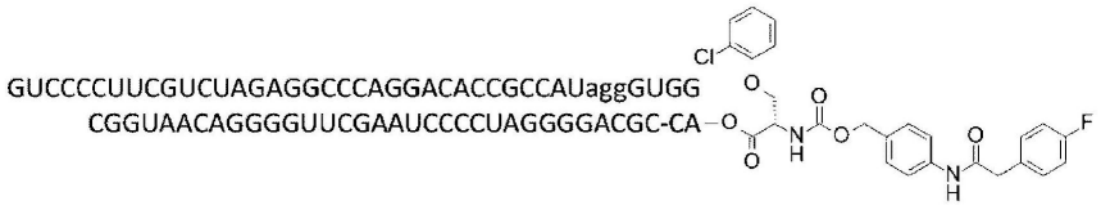
[1363] AAtR-27 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)agg

[1364] 

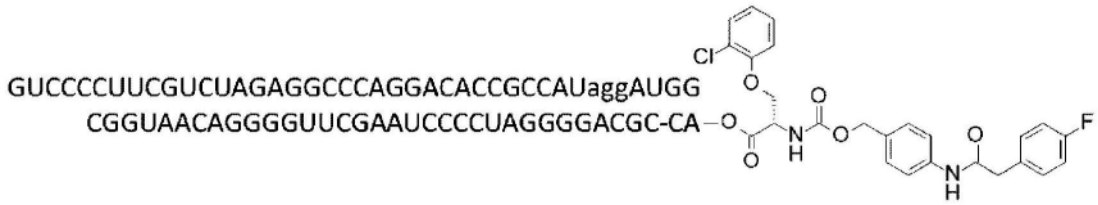
[1365] AAtR-28 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)agg

[1366] 

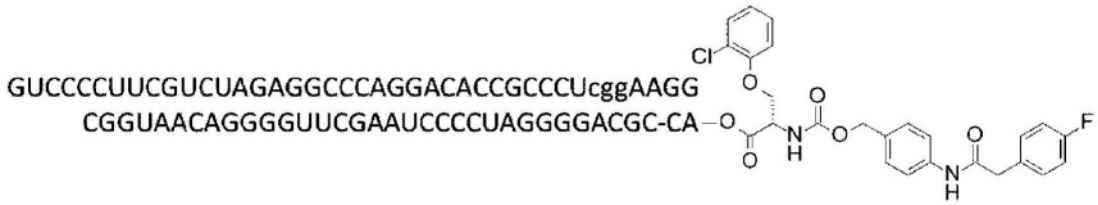
[1367] AAtR-29 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)agg

[1368] 

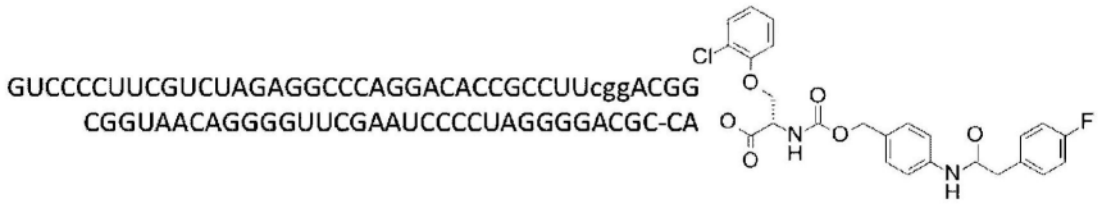
[1369] AAtR-30 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)agg

[1370] 

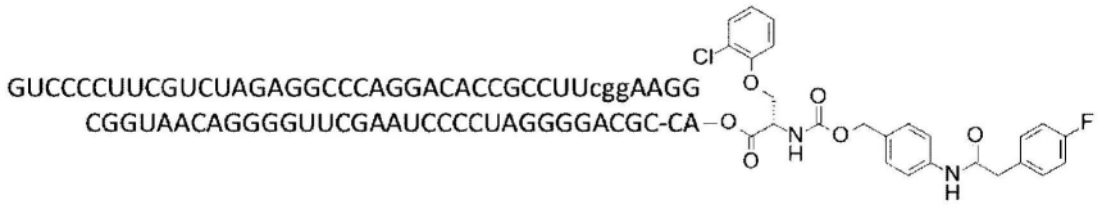
[1371] AAtR-31 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)cgg

[1372] 

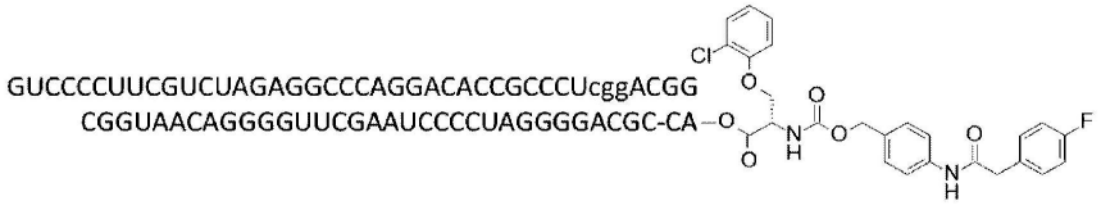
[1373] AAtR-32 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)cgg

[1374] 

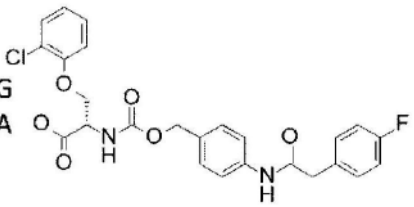
[1375] AAtR-33 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)cgg

[1376] 

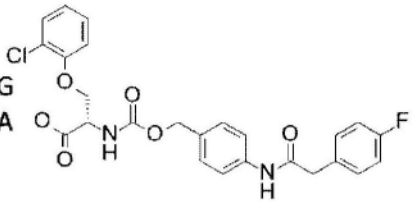
[1377] AAtR-34 SPh2Cl-tRNA(Glu2)cgg

[1378] 

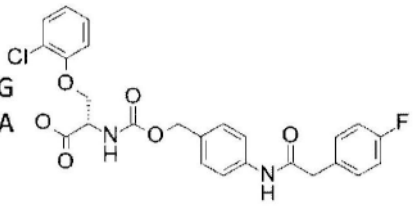
[1379] AAtR-35 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)cgg

[1380] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcggGAGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

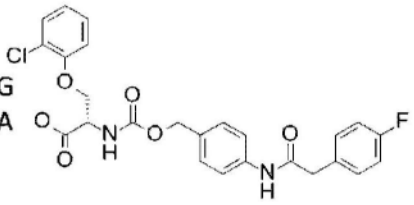
[1381] AAtR-36 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)cgg

[1382] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggAUGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

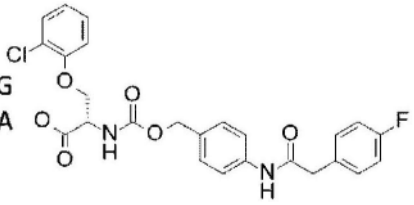
[1383] AAtR-37 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)cgg

[1384] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggGUGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

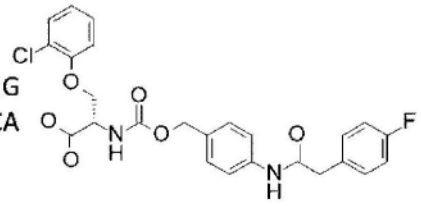
[1385] AAtR-38 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)cgg

[1386] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUcggGAGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

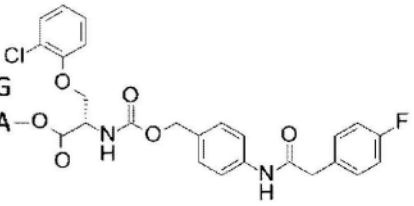
[1387] AAtR-39 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)cgg

[1388] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcggGUGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

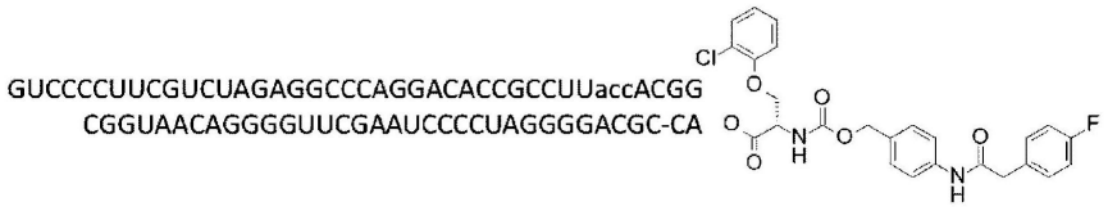
[1389] AAtR-40 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)cgg

[1390] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUcggAUGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

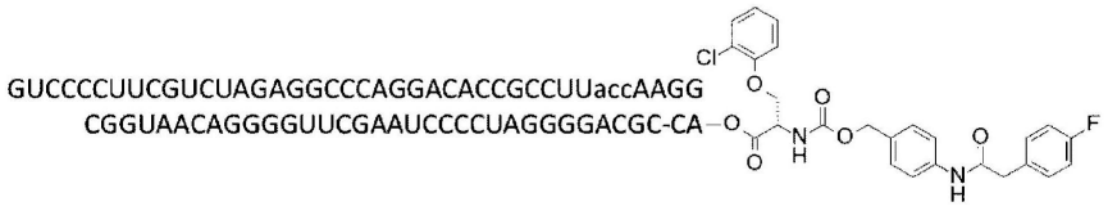
[1391] AAtR-41 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)acc

[1392] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaccAAGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

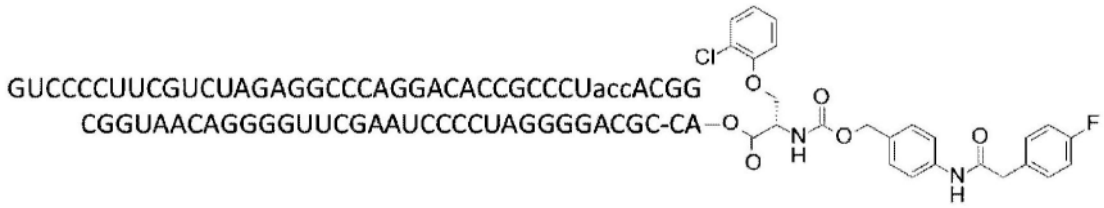
[1393] AAtR-42 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)acc

[1394] 

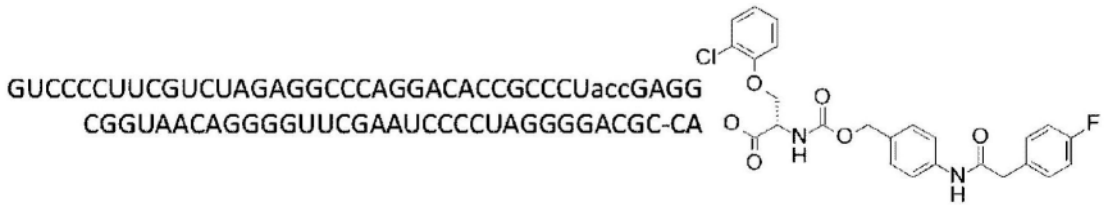
[1395] AAtR-43 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)acc

[1396] 

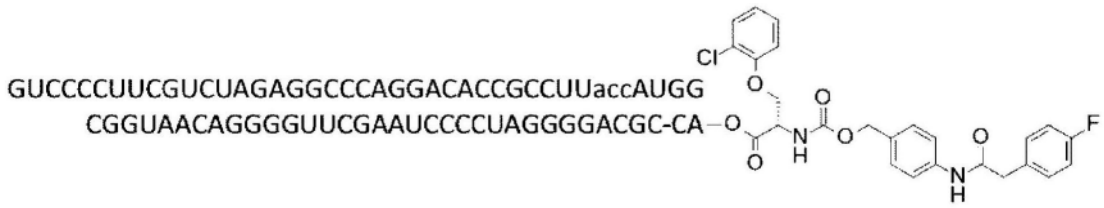
[1397] AAtR-44 SPh2Cl-tRNA(Glu2)acc

[1398] 

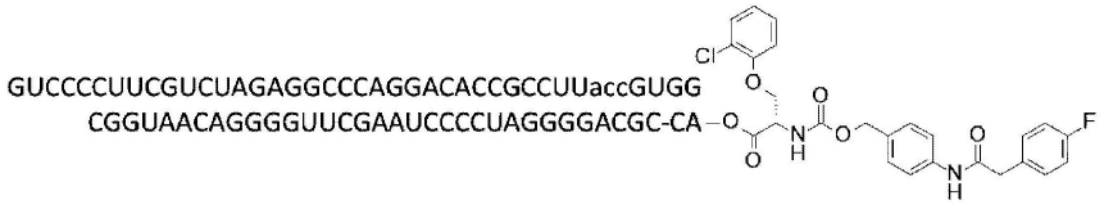
[1399] AAtR-45 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)acc

[1400] 

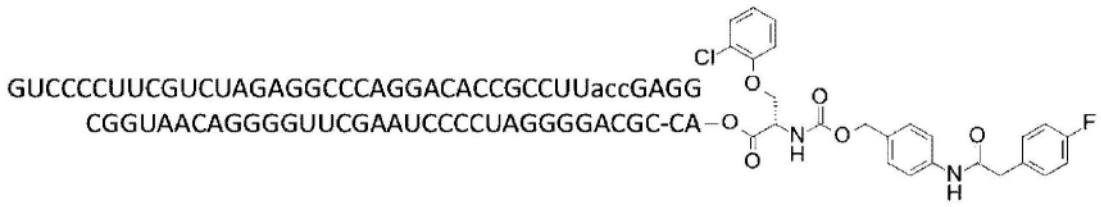
[1401] AAtR-46 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)acc

[1402] 

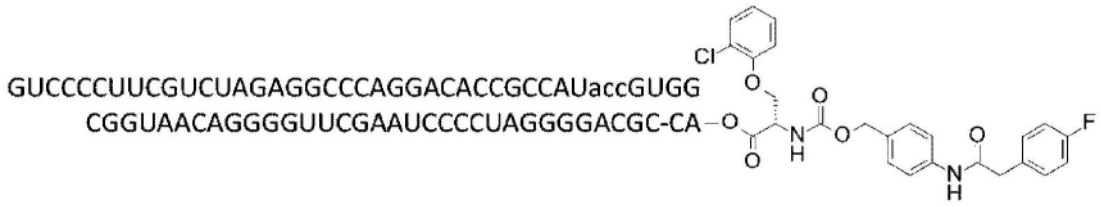
[1403] AAtR-47 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)acc

[1404] 

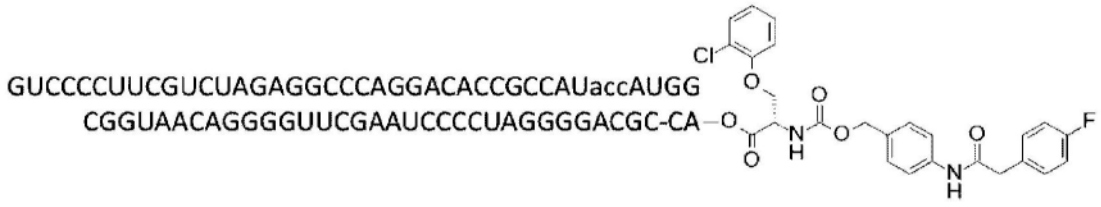
[1405] AAtR-48 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)acc

[1406] 

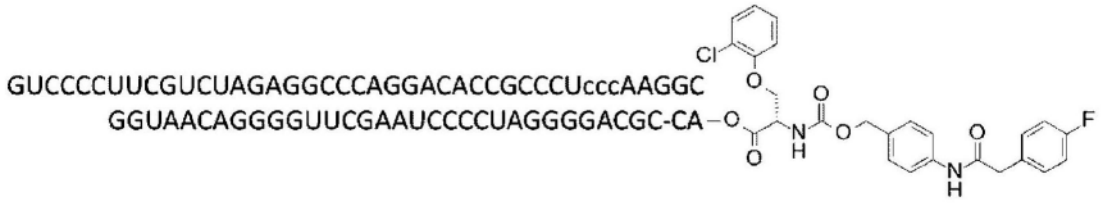
[1407] AAtR-49 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)acc

[1408] 

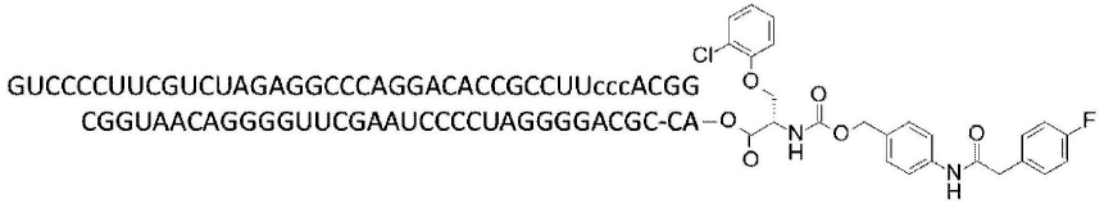
[1409] AAtR-50 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)acc

[1410] 

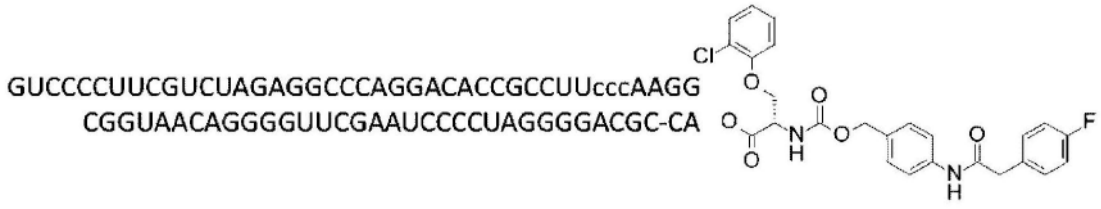
[1411] AAtR-51 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)ccc

[1412] 

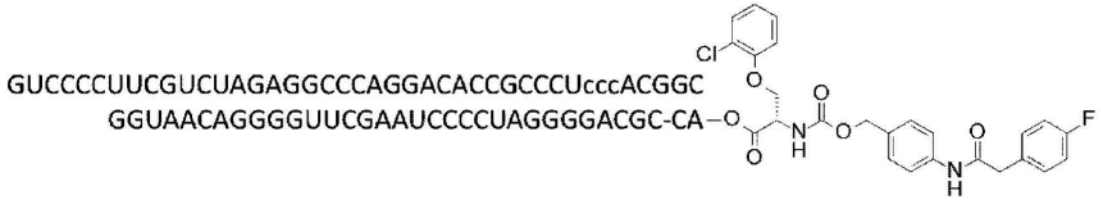
[1413] AAtR-52 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)ccc

[1414] 

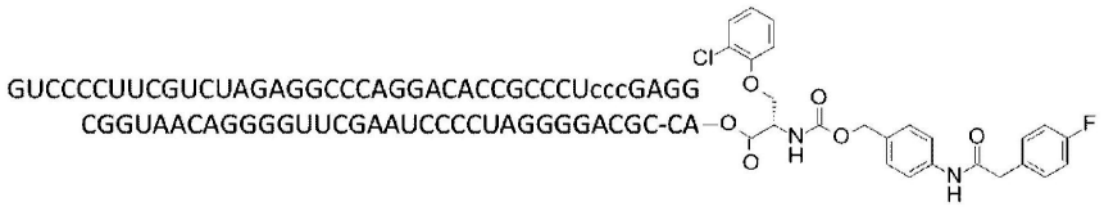
[1415] AAtR-53 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)ccc

[1416] 

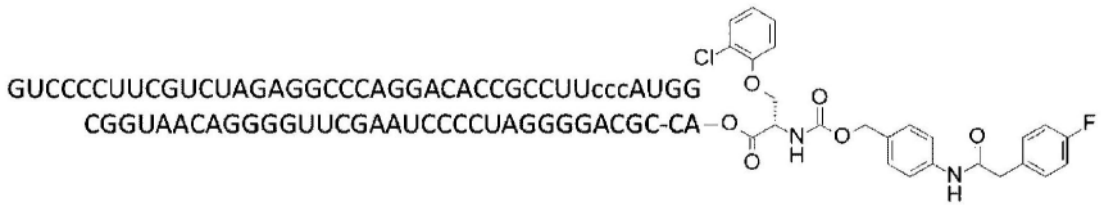
[1417] AAtR-54 SPh2Cl-tRNA(Glu2)ccc

[1418] 

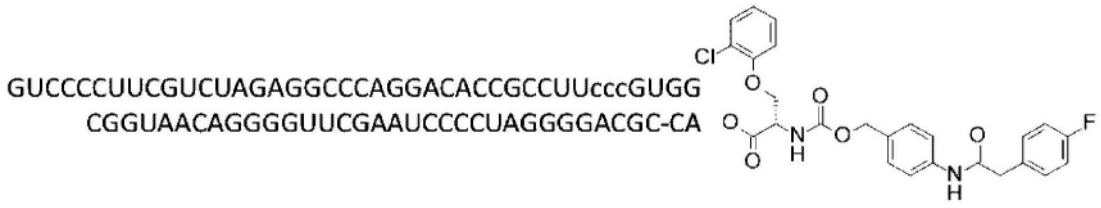
[1419] AAtR-55 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)ccc

[1420] 

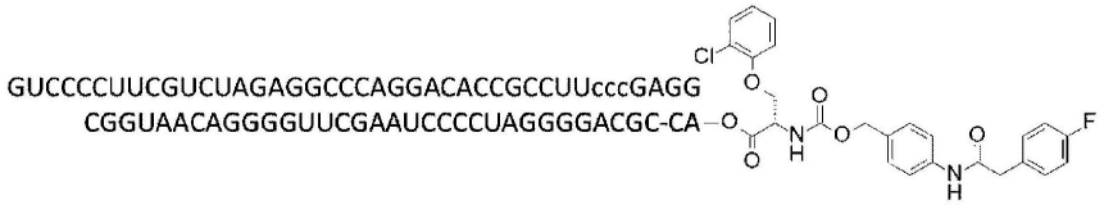
[1421] AAtR-56 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)ccc

[1422] 

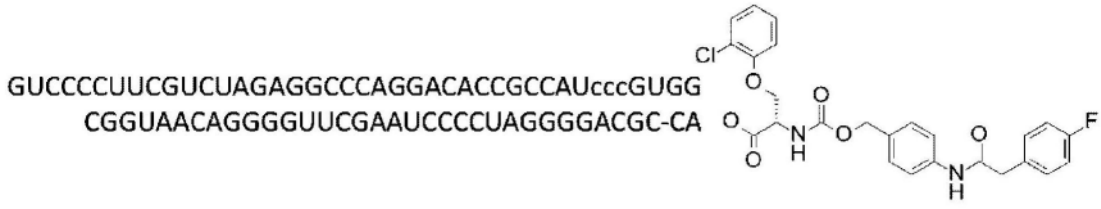
[1423] AAtR-57 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)ccc

[1424] 

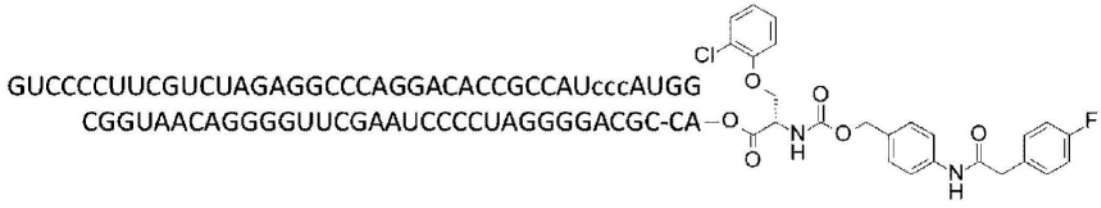
[1425] AAtR-58 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)ccc

[1426] 

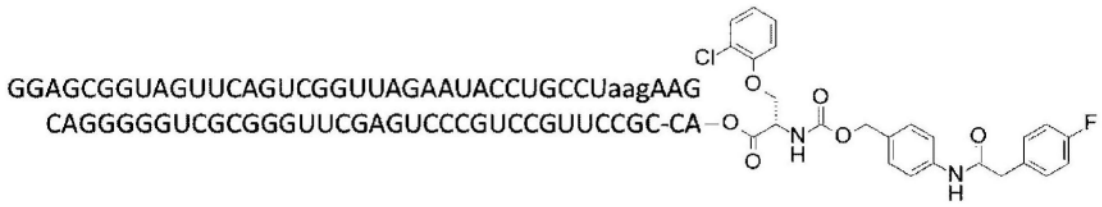
[1427] AAtR-59 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)ccc

[1428] 

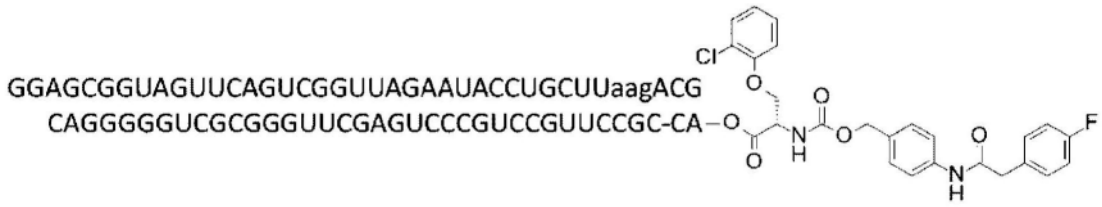
[1429] AAtR-60 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)ccc

[1430] 

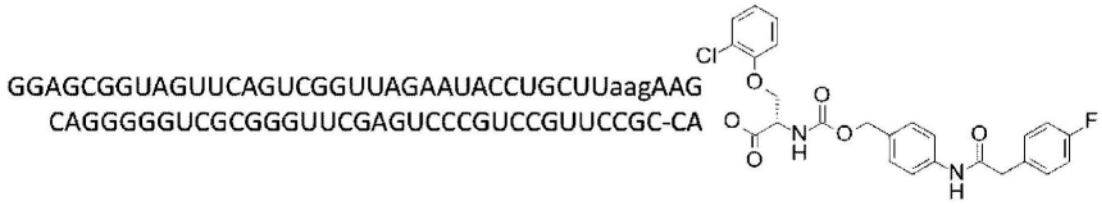
[1431] AAtR-61 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ser5)aag

[1432] 

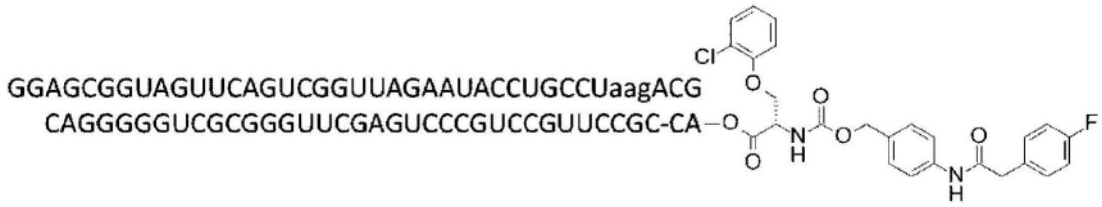
[1433] AAtR-62 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ala1B)aag

[1434] 

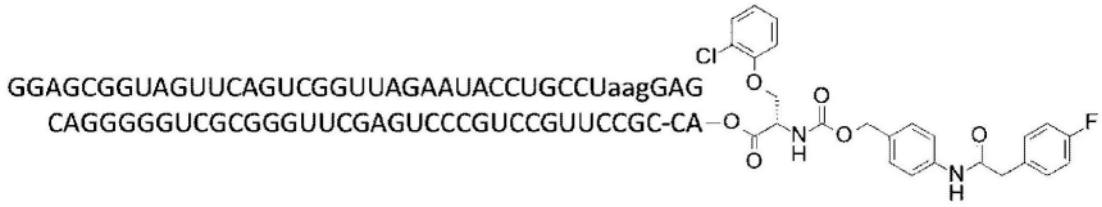
[1435] AAtR-63 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Phe)aag

[1436] 

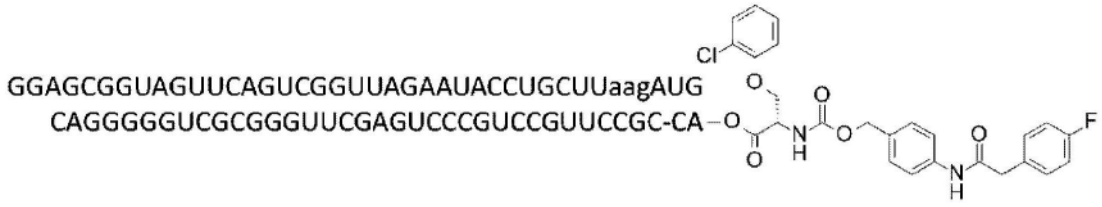
[1437] AAtR-64 SPh2Cl-tRNA(Asp1)aag

[1438] 

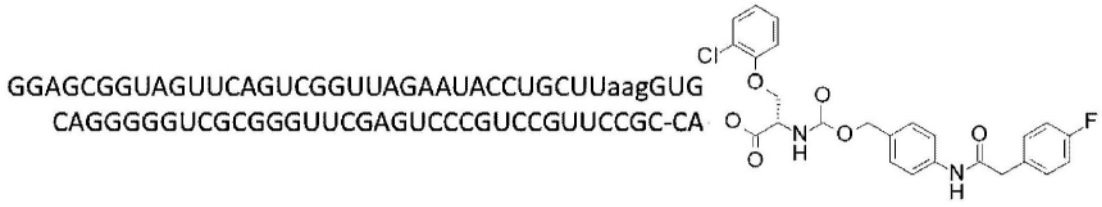
[1439] AAtR-65 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Arg3)aag

[1440] 

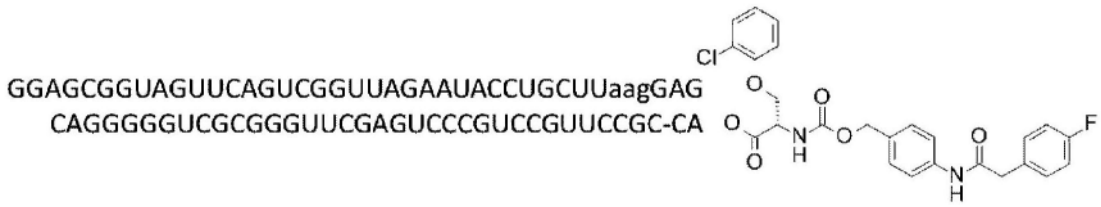
[1441] AAtR-66 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Val2)aag

[1442] 

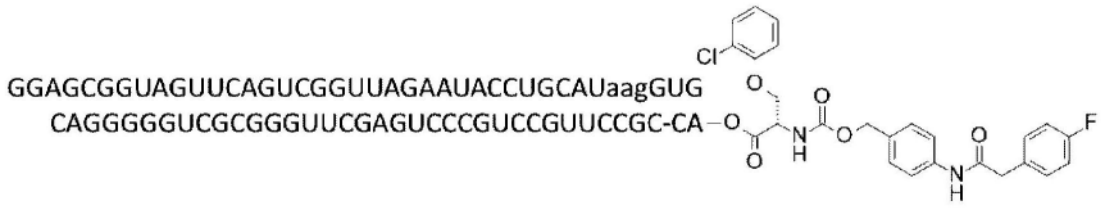
[1443] AAtR-67 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Leu2)aag

[1444] 

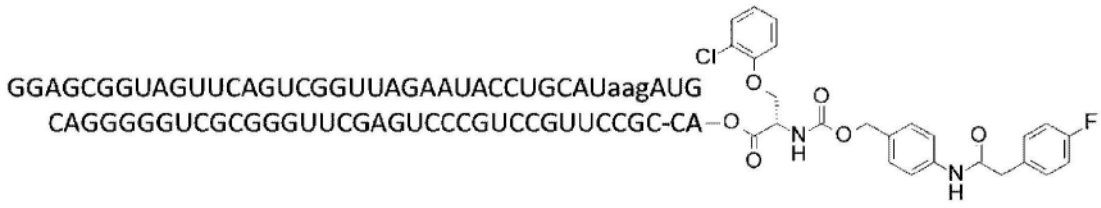
[1445] AAtR-68 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Pro3)aag

[1446] 

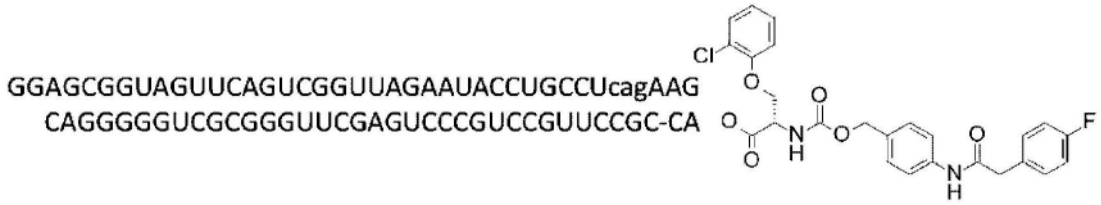
[1447] AAtR-69 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Pro2)aag

[1448] 

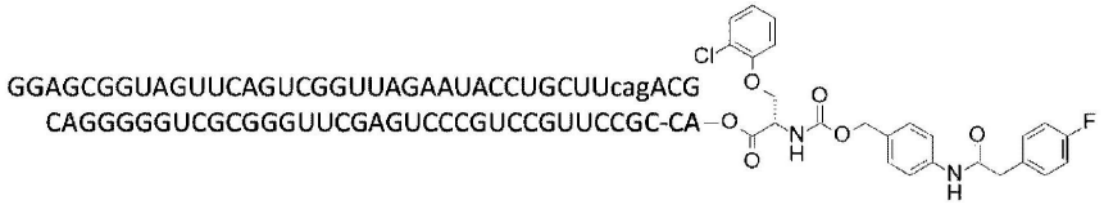
[1449] AAtR-70 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ala2)aag

[1450] 

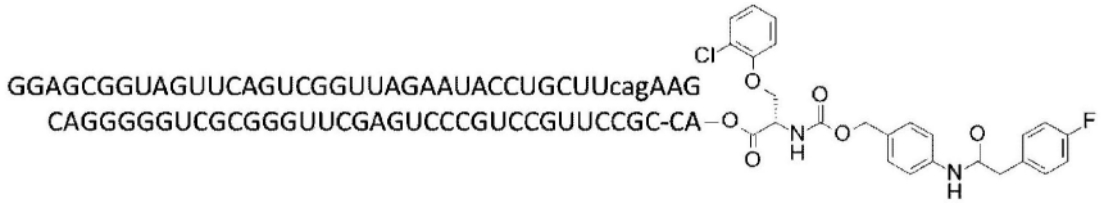
[1451] AAtR-71 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ser5)cag

[1452] 

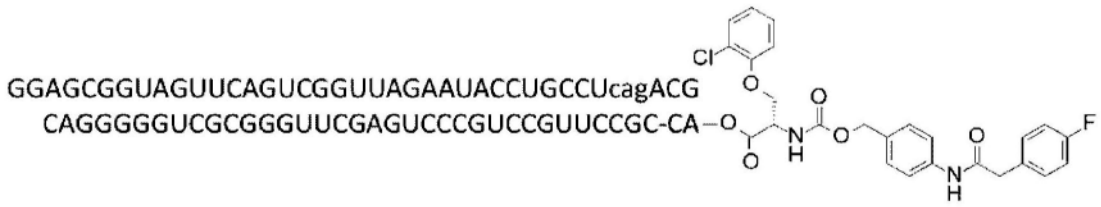
[1453] AAtR-72 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ala1B)cag

[1454] 

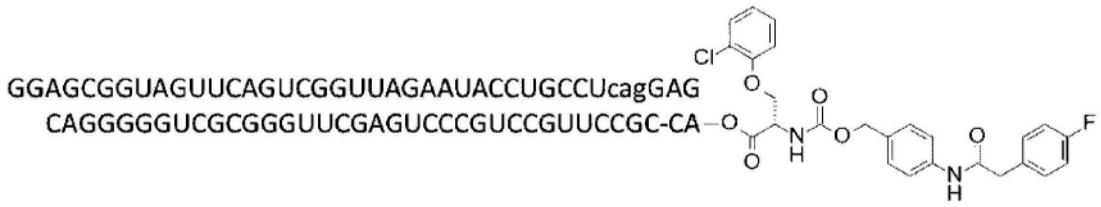
[1455] AAtR-73 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Phe)cag

[1456] 

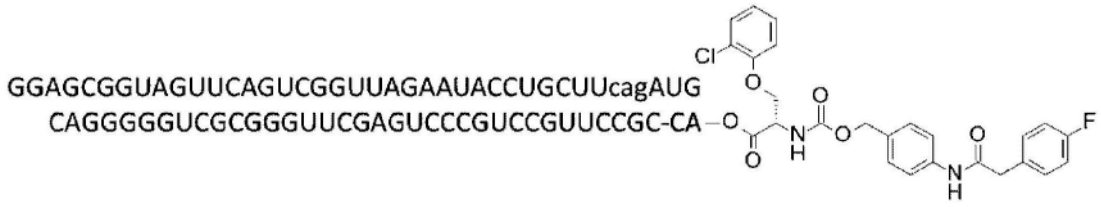
[1457] AAtR-74 SPh2Cl-tRNA(Asp1)cag

[1458] 

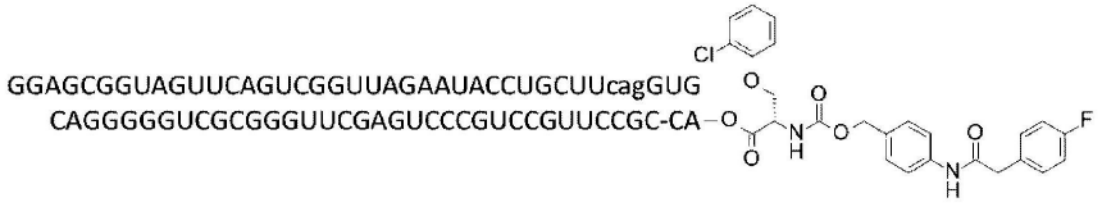
[1459] AAtR-75 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Arg3)cag

[1460] 

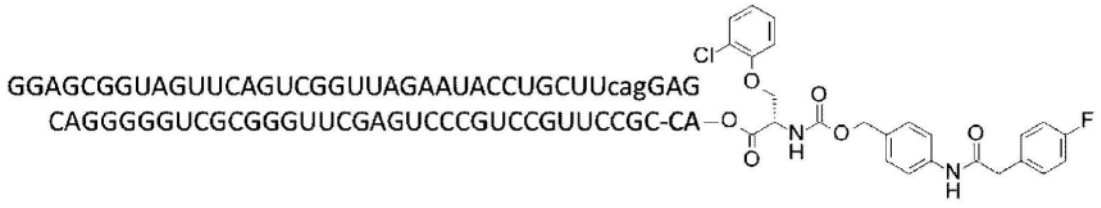
[1461] AAtR-76 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Val2)cag

[1462] 

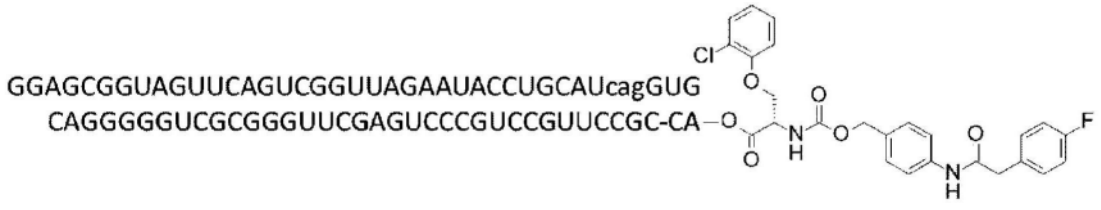
[1463] AAtR-77 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Leu2)cag

[1464] 

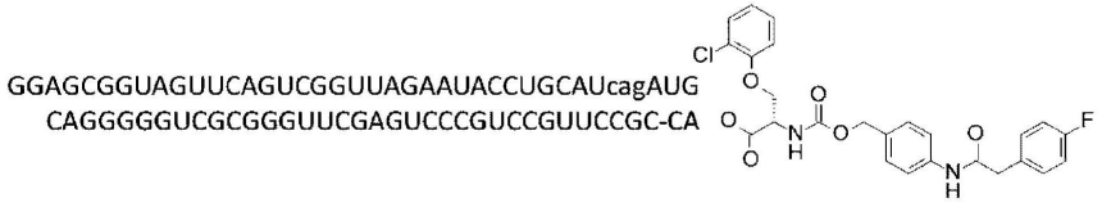
[1465] AAtR-78 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Pro3)cag

[1466] 

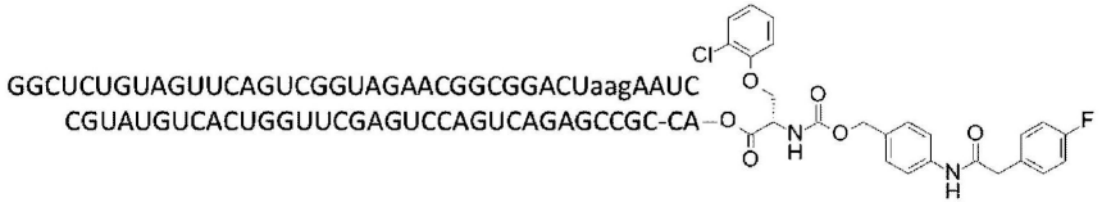
[1467] AAtR-79 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Pro2)cag

[1468] 

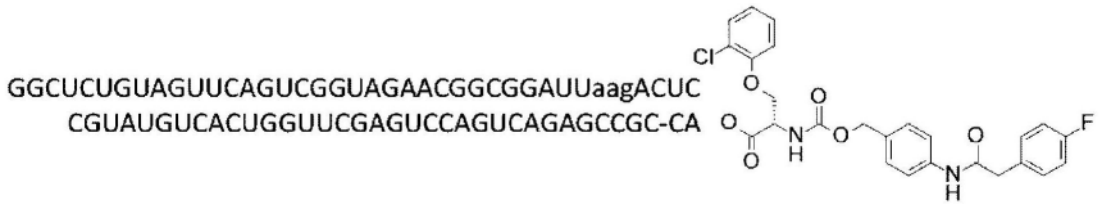
[1469] AAtR-80 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ala2)cag

[1470] 

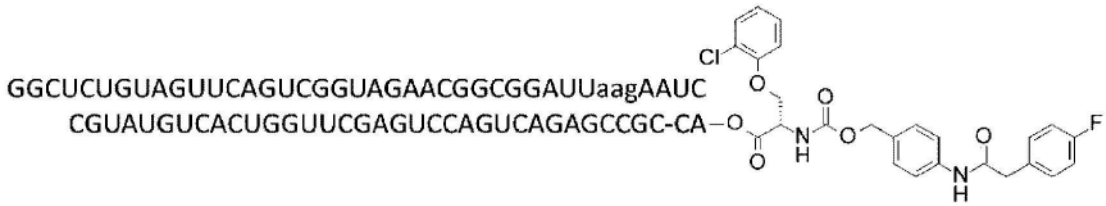
[1471] AAtR-81 SPh2Cl-tRNA(AsnE2)aag

[1472] 

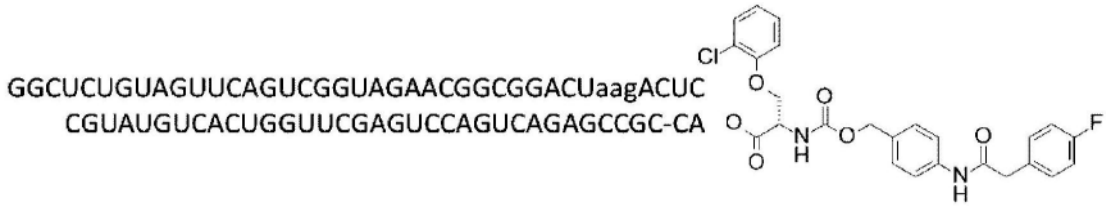
[1473] AAtR-82 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Ala1B)aag

[1474] 

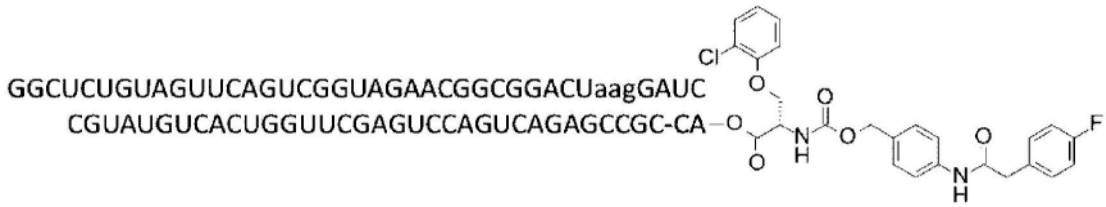
[1475] AAtR-83 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Phe)aag

[1476] 

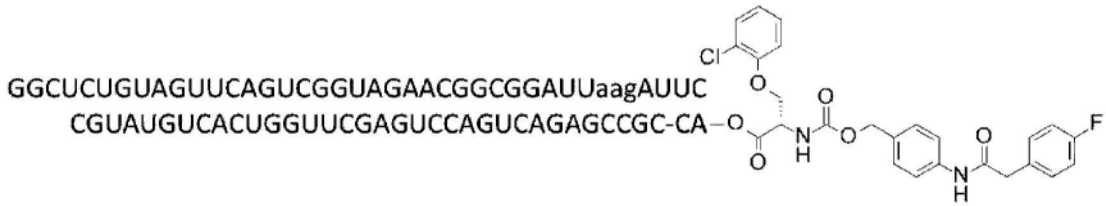
[1477] AAtR-84 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Glu2)aag

[1478] 

[1479] AAtR-85 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Arg3)aag

[1480] 

[1481] AAtR-86 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Val2)aag

[1482] 

[1483] AAtR-87 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)aag

[1484] 

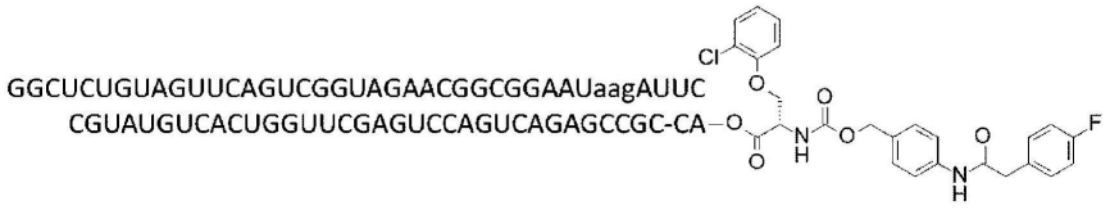
[1485] AAtR-88 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro3)aag

[1486] 

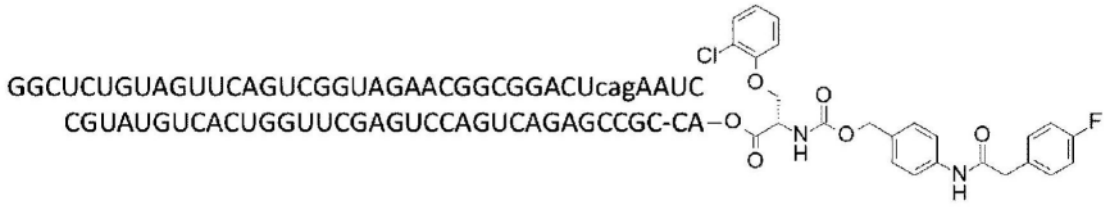
[1487] AAtR-89 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro2)aag

[1488] 

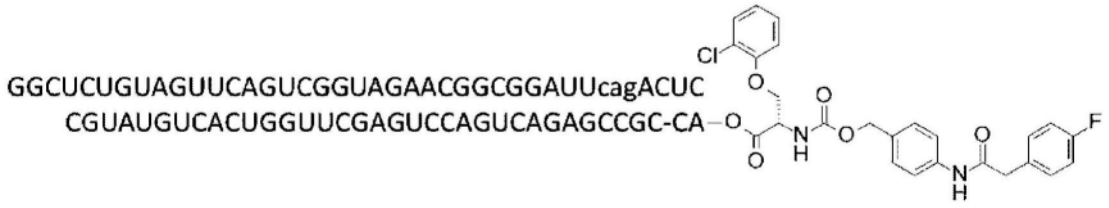
[1489] AAtR-90 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Ala2)aag

[1490] 

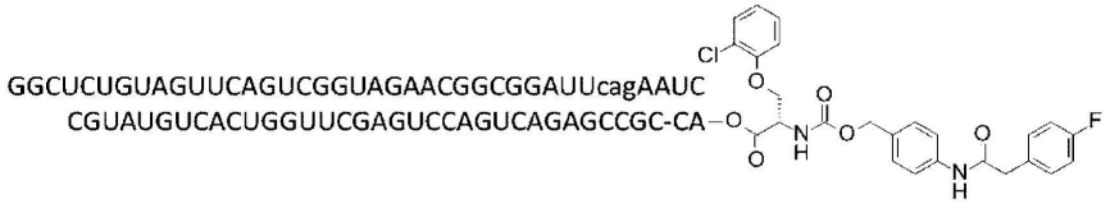
[1491] AAtR-91 SPh2Cl-tRNA(AsnE2)cag

[1492] 

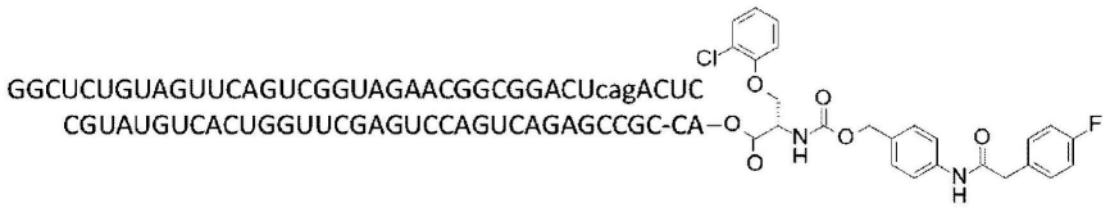
[1493] AAtR-92 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Ala1B)cag

[1494] 

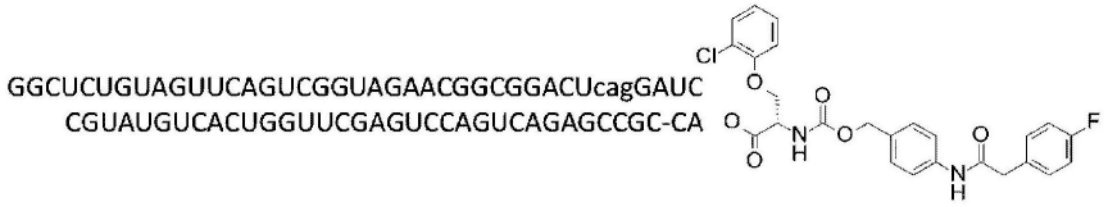
[1495] AAtR-93 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Phe)cag

[1496] 

[1497] AAtR-94 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Glu2)cag

[1498] 

[1499] AAtR-95 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Arg3)cag

[1500] 

[1501] AAtR-96 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Val2)cag

[1502] 

[1503] AAtR-97 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)cag

[1504] 

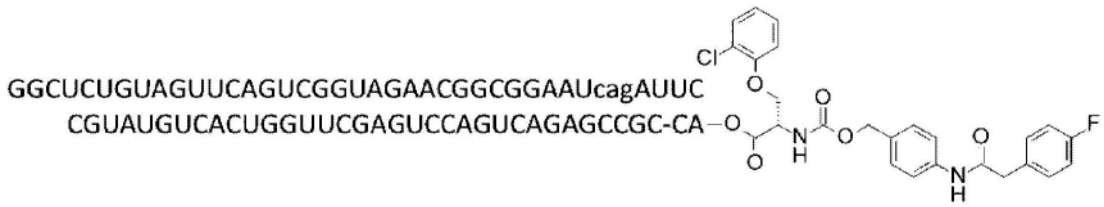
[1505] AAtR-98 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro3)cag

[1506] 

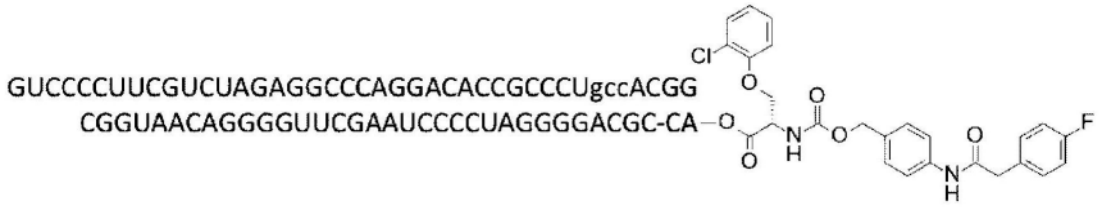
[1507] AAtR-99 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro2)cag

[1508] 

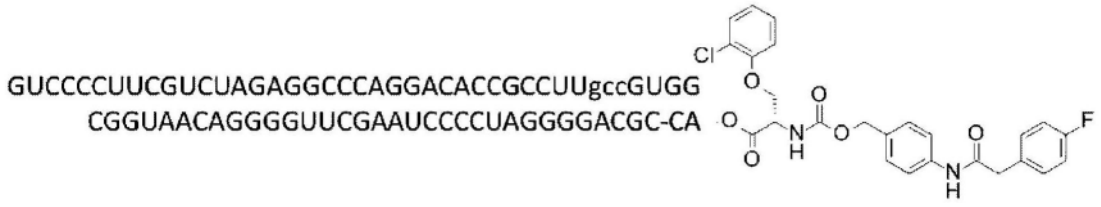
[1509] AAtR-100 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Ala2)cag

[1510] 

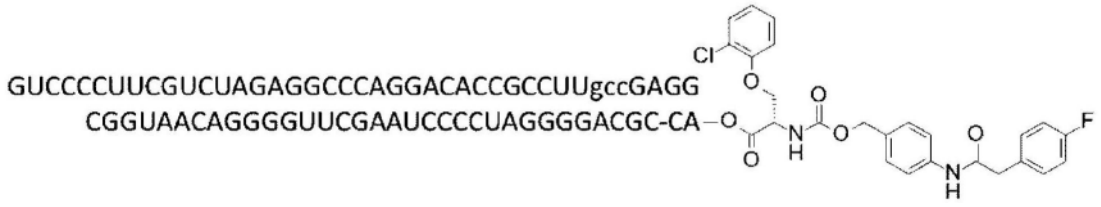
[1511] AAtR-101 SPh2Cl-tRNA(Glu2)gcc

[1512] 

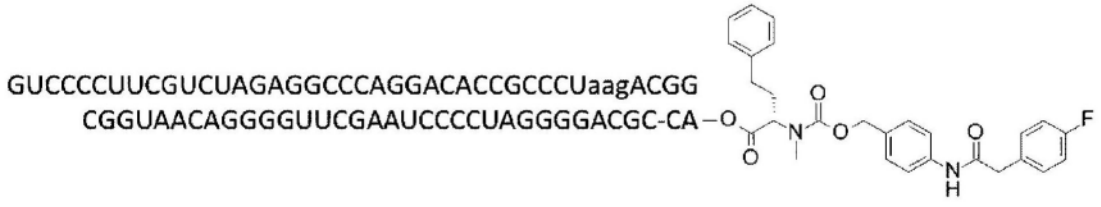
[1513] AAtR-102 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)gcc

[1514] 

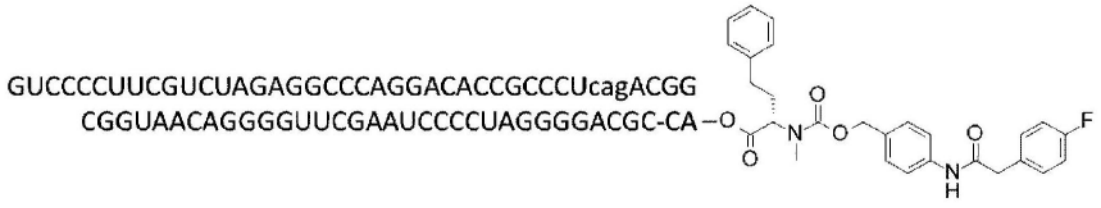
[1515] AAtR-103 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)gcc

[1516] 

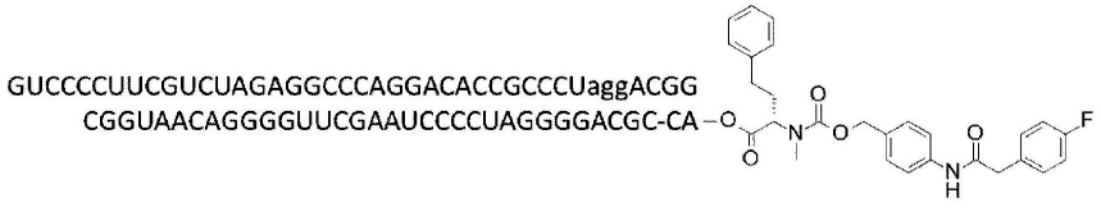
[1517] AAtR-104 MeHph-tRNA(Glu2)aag

[1518] 

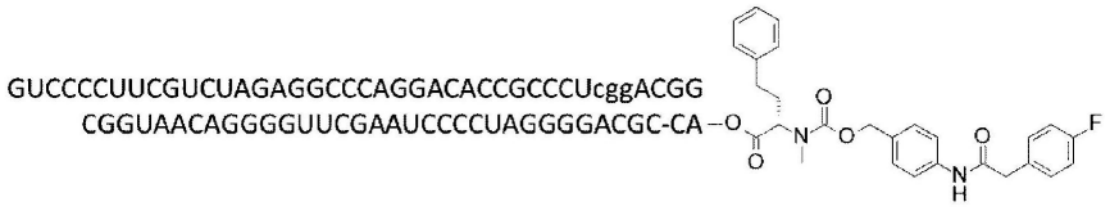
[1519] AAtR-105 MeHph-tRNA(Glu2)cag

[1520] 

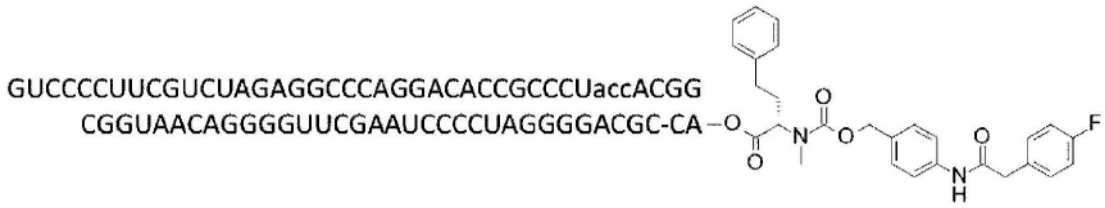
[1521] AAtR-106 MeHph-tRNA(Glu2)agg

[1522] 

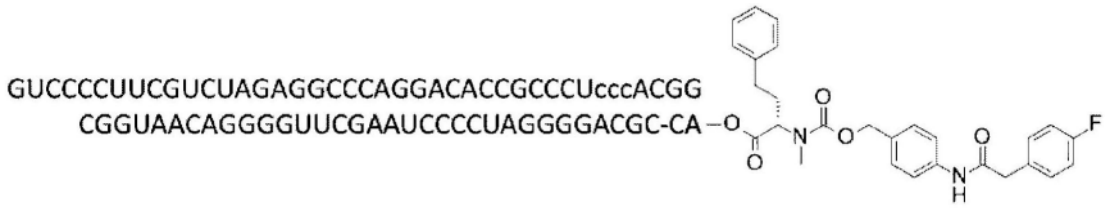
[1523] AAtR-107 MeHph-tRNA(Glu2)cgg

[1524] 

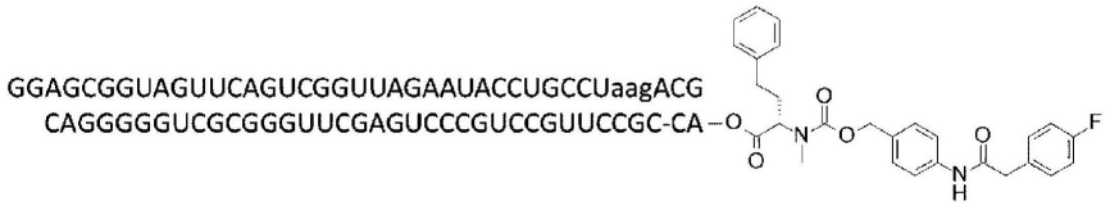
[1525] AAtR-108 MeHph-tRNA(Glu2)acc

[1526] 

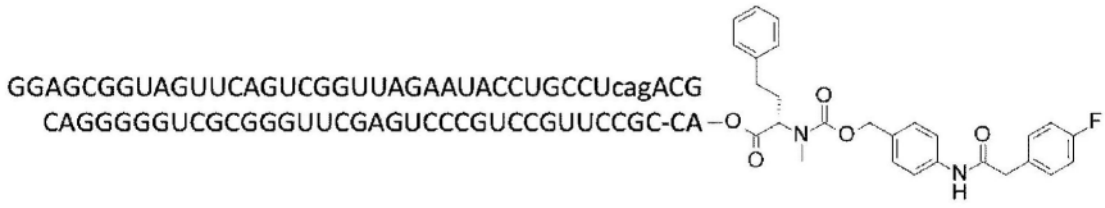
[1527] AAtR-109 MeHph-tRNA(Glu2)ccc

[1528] 

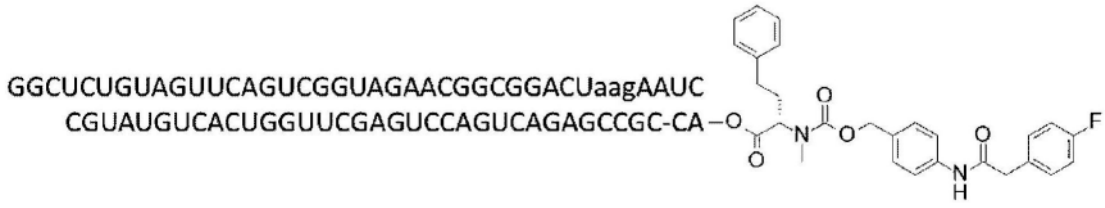
[1529] AAtR-110 MeHph-tRNA(Asp1)aag

[1530] 

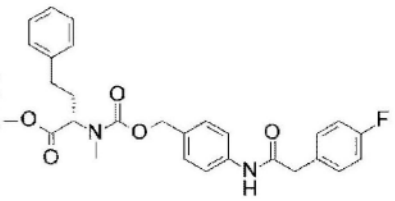
[1531] AAtR-111 MeHph-tRNA(Asp1)cag

[1532] 

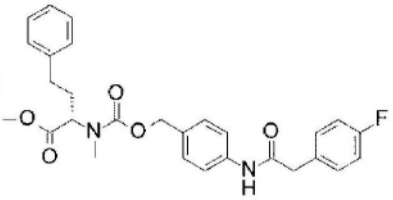
[1533] AAtR-112 MeHph-tRNA(AsnE2)aag

[1534] 

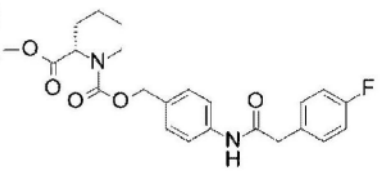
[1535] AAtR-113 MeHph-tRNA(AsnE2)cag

[1536] GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUcagAAUC CGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC-CA 

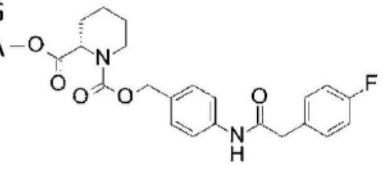
[1537] AAtR-114 MeHph-tRNA(Glu2)ucc

[1538] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUuccACGG CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

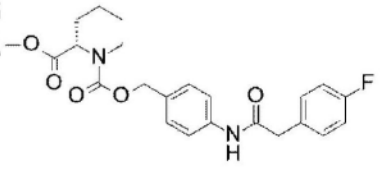
[1539] AAtR-115 Pic2-tRNA(Glu2)acc

[1540] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaccACGG CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

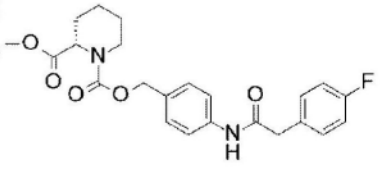
[1541] AAtR-116 Pic2-tRNA(Glu2+Leu2)acc

[1542] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGUGG CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

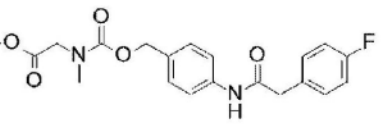
[1543] AAtR-117 Pic2-tRNA(Glu2+Pro3)acc

[1544] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGAGG CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

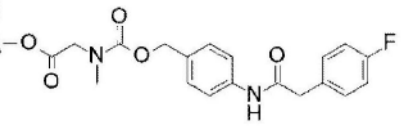
[1545] AAtR-118 Pic2-tRNA(Glu2+Ala2)acc

[1546] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaccAUGG CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

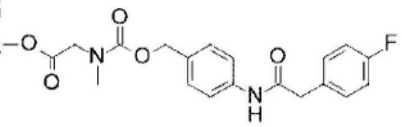
[1547] AAtR-119 MeG-tRNA(Glu2)acc

[1548] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaccACGG CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

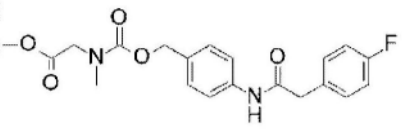
[1549] AAtR-120 MeG-tRNA(Glu2+Leu2)acc

[1550] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGUGG CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

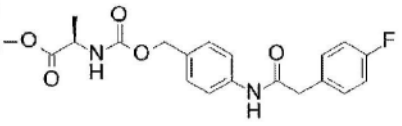
[1551] AAtR-121 MeG-tRNA(Glu2+Pro3)acc

[1552] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGAGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

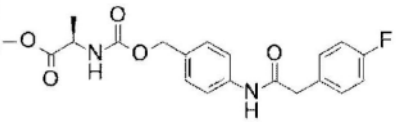
[1553] AAtR-122 MeG-tRNA(Glu2+Ala2)acc

[1554] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaccAUGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

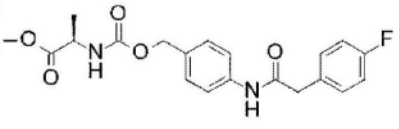
[1555] AAtR-123 dA-tRNA(Glu2)acc

[1556] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaccACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

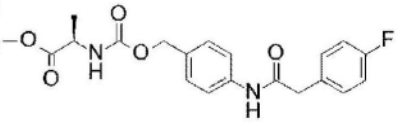
[1557] AAtR-124 dA-tRNA(Glu2+Leu2)acc

[1558] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGUGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

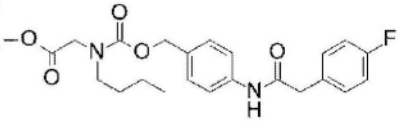
[1559] AAtR-125 dA-tRNA(Glu2+Pro3)acc

[1560] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCUUaccGAGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

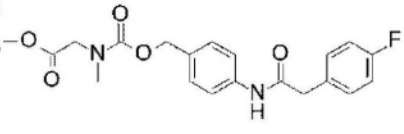
[1561] AAtR-126 dA-tRNA(Glu2+Ala2)acc

[1562] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCAUaccAUGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

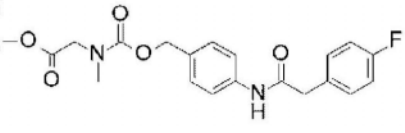
[1563] AAtR-127 nBuG-tRNA(Glu2)ccc

[1564] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcccACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

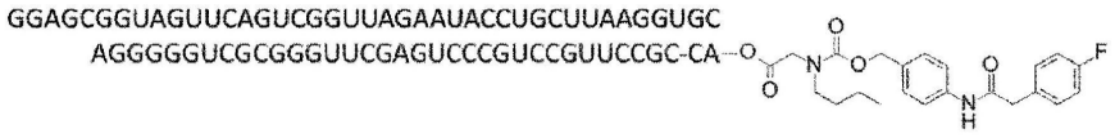
[1565] AAtR-129 MeG-tRNA(Glu2)agg

[1566] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaggACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

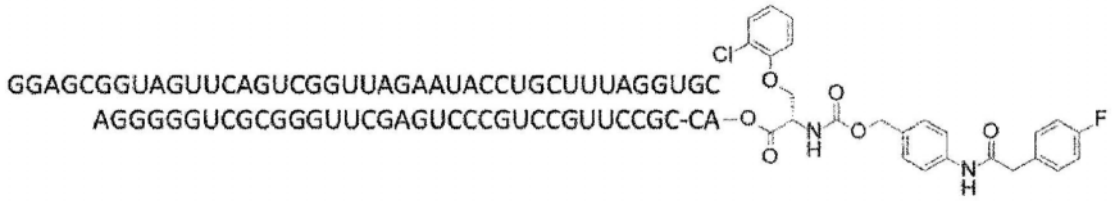
[1567] AAtR-130 MeG-tRNA(Glu2)cgg

[1568] GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUcggACGG
CGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGGGACGC-CA 

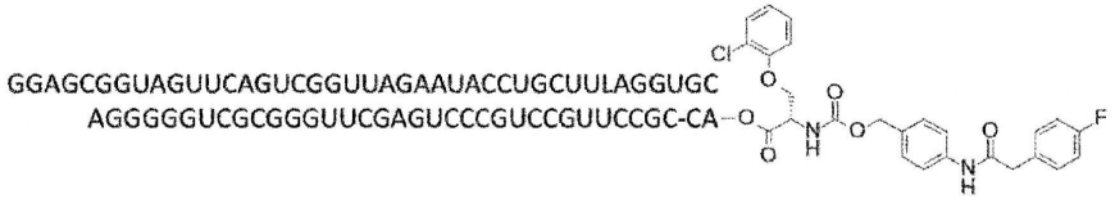
[1569] AAtR-131 nBuG-tRNA(Asp1+Leu2)aag

[1570] 

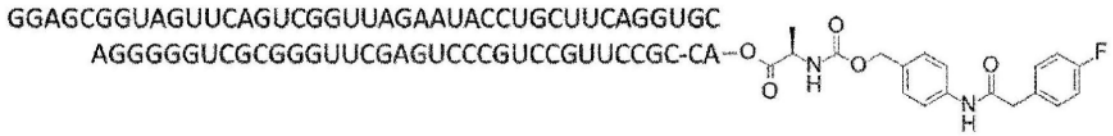
[1571] AAtR-132 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Leu2)uag

[1572] 

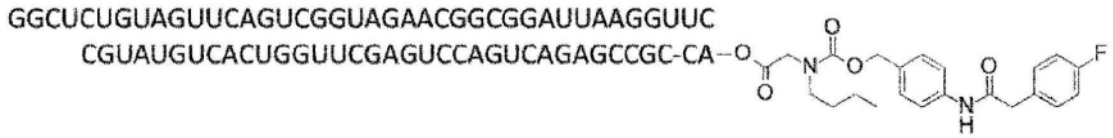
[1573] AAtR-133 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Leu2)Lag

[1574] 

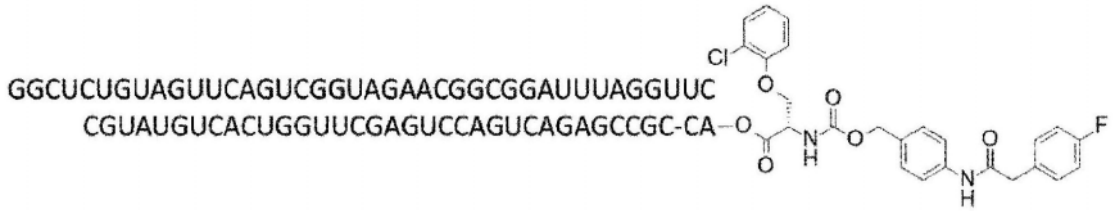
[1575] AAtR-134 dA-tRNA(Asp1+Leu2)cag

[1576] 

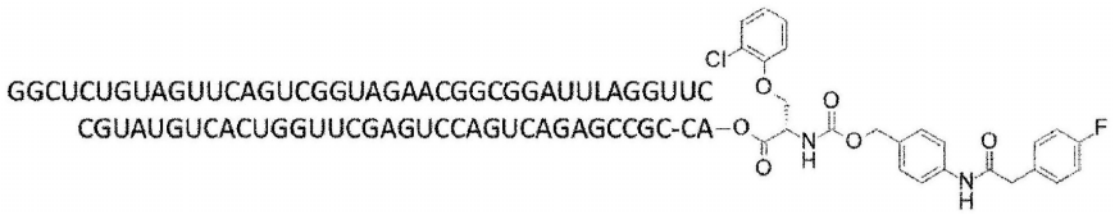
[1577] AAtR-135 nBuG-tRNA(AsnE2+Leu2)aag

[1578] 

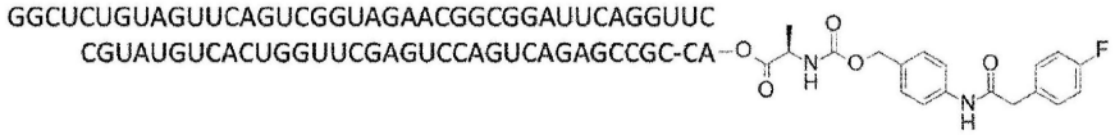
[1579] AAtR-136 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)uag

[1580] 

[1581] AAtR-137 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)Lag

[1582] 

[1583] AAtR-138 dA-tRNA(AsnE2+Leu2)cag

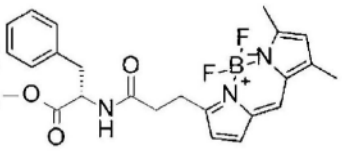
[1584] 

[1585] 使用氨酰pCpA的起始氨酰tRNA的制备

[1586] 用无核酸酶水制备混合的反应液，使得为25μM转录tRNA(fMet)cau-CA(TR-105)，50mM HEPES-KOH pH 7.5，20mM $MgCl_2$，1mM ATP，0.6Unit/μL T4 RNA连接酶(New England bio lab公司)，0.25mM氨酰pCpA(MT01)，于15℃进行了连接反应45分钟。将加入T4 RNA连接酶及氨酰pCpA前的反应液于95℃加热2分钟之后，于室温放置5分钟，预先进行tRNA的再折叠。

[1587] 向连接反应液，以使其成为0.3M加入乙酸钠，进行苯酚-氯仿提取，制备了起始氨酰tRNA(AAtR-128)。通过乙醇沉淀回收AAtR-128，在添加到翻译混合物中前将AAtR-128溶解于1mM乙酸钠水溶液。

[1588] AAtR-128 BdpFL-Phe-tRNA(fMet)cau

[1589] GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUcauAAC
CCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAAC-CA 

[1590] 实施例5 mRNA的制备

[1591] 由模板DNA(MD-1～MD-8)，通过使用RiboMAX大规模RNA制备系统T7(Promega公司，P1300)的体外转录反应而合成模板mRNA(MR-1～MR-8)，利用RNeasy mini试剂盒(Qiagen公司)纯化。

[1592] 模板DNA SEQ ID No:221(MD-1)

[1593] DNA序列：

[1594] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TcttATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[1595] 模板DNA SEQ ID No:222(MD-2)

[1596] DNA序列：

[1597] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TctgATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[1598] 模板DNA SEQ ID No:223(MD-3)

[1599] DNA序列：

[1600] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TcctATTATTGCTATTGGTTAAGCTTCG

[1601] 模板DNA SEQ ID No:224(MD-4)

[1602] DNA序列：

[1603] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TccgATTATTGCTATTGGTTAAGCTTCG

[1604] 模板DNA SEQ ID No:225(MD-5)

[1605] DNA序列：

[1606] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT TggtATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

[1607] 模板DNA SEQ ID No:226(MD-6)

[1608] DNA序列：

[1609] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT TgggATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

[1610] 模板DNA SEQ ID No:227(MD-7)

[1611] DNA序列：

[1612] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT TggaATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

[1613] 模板DNA SEQ ID No:228(MD-8)

[1614] DNA序列：

[1615] GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT TctaATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[1616] 模板DNA SEQ ID No:229(MR-1)

[1617] DNA序列：

[1618] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUcuuAUUAUUCCGAUUGGUUA AGCUUCG

[1619] 模板DNA SEQ ID No:230(MR-2)

[1620] DNA序列：

[1621] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUcugAUUAUUCCGAUUGGUUA AGCUUCG

[1622] 模板DNA SEQ ID No:231(MR-3)

[1623] DNA序列：

[1624] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUccuAUUAUUGCUAUUGGUUA AGCUUCG

[1625] 模板DNA SEQ ID No:232(MR-4)

[1626] DNA序列：

[1627] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUccgAUUAUUGCUAUUGGUUA AGCUUCG

[1628] 模板DNA SEQ ID No:233(MR-5)

[1629] DNA序列：

[1630] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUCUAUUUgguAUUAUUCCGAUUCUAUA AGCUUCG

[1631] 模板DNA SEQ ID No:234(MR-6)

[1632] DNA序列：

[1633] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUCUAUUUgggAUUAUUCCGAUUCUAUAAGCUUCG

[1634] 模板DNA SEQ ID No:235(MR-7)

[1635] DNA序列：

[1636] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUCUAUUUggaAUUAUUCCGAUUCUAUAAGCUUCG

[1637] 模板DNA SEQ ID No:236(MR-8)

[1638] DNA序列：

[1639] GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUcuaAUUAUUCCGAUUGGUUAAGCUUCG

[1640] 实施例6肽的翻译合成

[1641] 实施例6-1

[1642] 为了评价tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合对翻译的准确性给予的影响,在具有与相同密码子盒内的不同密码子对应的相反密码子的2种延长氨酰tRNA的存在下进行翻译实验。

[1643] 具体而言,将模板mRNA(MR-2)使用氨酰tRNA(AAtR-1～AAtR-10中的任一种和AAtR-105),模板mRNA(MR-1)使用氨酰tRNA(AAtR-11～AAtR-20中的任一种和AAtR-104),模板mRNA(MR-4)使用氨酰tRNA(AAtR-21～AAtR-30中的任一种和AAtR-107),模板mRNA(MR-3)使用氨酰tRNA(AAtR-31～AAtR-40中的任一种和AAtR-106),模板mRNA(MR-6)使用氨酰tRNA(AAtR-41～AAtR-50中的任一种和AAtR-109),将模板mRNA(MR-5)使用氨酰tRNA(AAtR-51～AAtR-60中的任一种和AAtR-108)翻译,翻译合成了肽。需要说明的是,在本说明书中“AAtR”和“AATR”以相同意义使用。即,“AAtR-105”和“AATR-105”表示相同的tRNA。

[1644] 翻译条件1

[1645] 进行了评价基于具有反密码子agg的tRNA引起的密码子CCG的误读的量的翻译实验。翻译体系使用了为源自原核生物的重建无细胞蛋白质合成体系的PURE system。具体而言,在翻译液(1mM GTP,1mM ATP,20mM磷酸肌酸,50mM HEPES-KOH pH 7.6,100mM乙酸钾,10mM乙酸镁,2mM亚精胺,1mM二硫苏糖醇,源自1.5mg/mL E.coli MRE600(无RNase)的tRNA(Roche公司),0.24μM或0.26μM EF-G,0.24μM RF2,0.17μM RF3,0.5μM RRF,3.7μM或4μg/mL肌酸激酶,2.8μM或3μg/mL肌激酶,1.9单位或2单位/mL无机焦磷酸酶,1.0μg/mL或1.1μg/mL核苷二磷酸激酶,2.5μM或2.7μM IF1,0.37μM或0.4μM IF2,1.4μM或1.5μM IF3,37.2μM或40μM EF-Tu,49μM或54.1μM或54.9μM或59μM EF-Ts,0.93μM或1μM EF-P-Lys,0.4单位/μL RNasin(注册商标)Ribonuclease抑制剂(Promega公司,N2111),1.1μM或1.2μM核糖体,0.5mM PGA)中,ARSmix(从0.09μM GlyRS,0.4μM或0.97μM IleRS,0.68μM或1.64μM PheRS,0.16μM或0.39μM ProRS,0.09μM或0.22μM ThrRS,2.73μM AlaRS、0.04μM或0.097μM LeuRS、0.04μM SerRS、0.02μM ValRS中选择mRNA编码氨基酸的ARS的选择物),以使得1μM模板mRNA

(MR-4)，由模板mRNA编码的天然氨基酸组各0.25mM，起始氨酰tRNA(AAtR-128)10μM，延长氨酰tRNA(AAtR-21～AAtR-30中的任一种，及AAtR-107)分别为10μM的方式添加到翻泽反应混合物中，于37℃静置1小时进行翻译。以下，有时将该翻译条件称为“翻译条件1”。

[1646] 以作为翻译产物，翻译使得为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:241(Pep-3)本说明书中，有时像这样将氨基酸以冒号进行分隔而表示氨基酸序列)的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的密码子的误读，则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242(Pep-4))。

[1647] 进行了评价由具有反密码子cgg的tRNA引起的密码子CCU的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-3)，及延长氨酰tRNA(AAtR-31～AAtR-40中的任一种，及AAtR-106)，除此以外，按照上述翻译条件1进行翻译。

[1648] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:241(Pep-3))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读，则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242(Pep-4))。

[1649] 进行了评价由具有反密码子acc的tRNA引起的密码子GGG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-6)，及延长氨酰tRNA(AAtR-41～AAtR-50中任一种，及AAtR-1093)，除此以外，按照上述翻译条件1进行翻译。

[1650] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243(Pep-5))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读，则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244(Pep-6))。

[1651] 进行了评价由具有反密码子ccc的tRNA引起的密码子GGU的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-5)，及延长氨酰tRNA(AAtR-51～AAtR-60中任一种，及AAtR-108)，除此以外，按照上述翻译条件1进行翻译。

[1652] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243(Pep-5))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读，则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244(Pep-6))。

[1653] 进行了评价由具有反密码子aag的tRNA引起的密码子CUG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-2)，及延长氨酰tRNA(AAtR-1～AAtR-10中任一种，及AAtR-105)，除此以外，按照上述翻译条件1进行翻译。

[1654] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239(Pep-1))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读，则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240(Pep-2))。

[1655] 进行了评价由具有反密码子cag的tRNA引起的密码子CUU的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-1)，延长氨酰tRNA(AAtR-11～AAtR-20中任一种，及AAtR-104)，除此以外，按照上述翻译条件1进行翻译。

[1656] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239(Pep-1))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240(Pep-2))。

[1657] 实施例6-2

[1658] 改变tRNA体,进行与实施例6-1相同的实验。具体而言,将模板mRNA(MR-2)使用氨酰tRNA(AAtR-61～AAtR-70中的任一种和AAtR111),模板mRNA(MR-1)使用氨酰tRNA(AAtR-71～AAtR-80中的任一种和AAtR-110),模板mRNA(MR-2)使用氨酰tRNA(AAtR-81～AAtR-90中的任一种和AAtR-113),模板mRNA(MR-1)使用氨酰tRNA(AAtR-91～AAtR-100中的任一种和AAtR-112)翻译,翻译合成了肽。

[1659] 翻译条件

[1660] 进行了评价由具有反密码子aag的tRNA引起的密码子CUG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-2),及延长氨酰tRNA(AAtR-81～AAtR-90中任一种,及AAtR-113),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1661] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239(Pep-1))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240(Pep-2))。

[1662] 进行了评价由具有反密码子cag的tRNA引起的密码子CUU的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-1),及延长氨酰tRNA(AAtR-91～AAtR-100中任一种,及AAtR-112),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1663] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239(Pep-1))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240(Pep-2))。

[1664] 进行了评价由具有反密码子aag的tRNA引起的密码子CUG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-2),及延长氨酰tRNA(AAtR-61～AAtR-70中任一种,及AAtR-111),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1665] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239(Pep-1))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240(Pep-2))。

[1666] 进行了评价由具有反密码子cag的tRNA引起的密码子CUU的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-1),及延长氨酰tRNA(AAtR-71～AAtR-80中任一种,及AAtR-110),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1667] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:239(Pep-1))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:240(Pep-2))。

[1668] 实施例6-3

[1669] 改变使用的密码子,进行与实施例6-1及6-2相同的实验。具体而言,将模板mRNA(MR-7)使用氨酰tRNA(AAtR-44,AAtR-47或AAtR-48的任一种和AAtR-114),模板mRNA(MR-7)使用氨酰tRNA(AAtR-101～AAtR-103的任一种和AAtR-114),模板mRNA(MR-6)使用氨酰tRNA(AAtR-101～AAtR-103的任一种和AAtR-109)翻译,翻译合成了肽。

[1670] 翻译条件

[1671] 进行了评价由具有反密码子acc的tRNA引起的密码子GGA的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-7),及延长氨酰tRNA(AAtR-44,AAtR-47及AAtR-48中任一种,以及AAtR-114),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1672] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243(Pep-5))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244(Pep-6))。

[1673] 进行了评价由具有反密码子gcc的tRNA引起的密码子GGA的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-7),及延长氨酰tRNA(AAtR-101～AAtR-103中任一种,及AAtR-114),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1674] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243(Pep-5))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244(Pep-6))。

[1675] 进行了评价由具有反密码子gcc的tRNA引起的密码子GGG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-6),及延长氨酰tRNA(AAtR-101～AAtR-103中任一种,及AAtR-109),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1676] 以翻译使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243(Pep-5))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:244(Pep-6))。

[1677] 实施例6-4

[1678] 使用反密码子的第一个字母被修饰的tRNA(反密码子的第一个字母的核苷为赖胞苷的tRNA),进行与实施例6-1～6-3相同的实验。具体而言,将模板mRNA(MR-1,MR-8,或MR-2)-氨酰tRNA(AAtR-132或AAtR-133的任一种和,AAtR-131及AAtR-134),或氨酰tRNA(AAtR-136或AAtR-137的任一种和AAtR-135及AAtR-138),除此以外,按照上述翻译条件1翻译,翻译合成了肽。比较了以下翻译产物的翻译量。

[1679] BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:250(Pep-12))

[1680] BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:251(Pep-13))

[1681] BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly(SEQ ID No:252(Pep-14))

[1682] 实施例6-5

[1683] 改变氨基酸,进行与实施例6-1～6-4相同的实验。具体而言,将模板mRNA(MR-6)使用氨酰tRNA(AAtR-115～AAtR-118的任一种和AAtR-109,或者AAtR-119～AAtR-122的任一种和AAtR-109,或者AAtR-123～AAtR-126的任一种和AAtR-127),模板mRNA(MR-4)使用氨酰tRNA(AAtR-21～AAtR-30中的任一种和AAtR-130),模板mRNA(MR-3)使用氨酰tRNA(AAtR-31～AAtR-40中的任一种和AAtR-129)翻译,翻译合成了肽。

[1684] 翻译条件

[1685] 进行了评价由具有反密码子acc的tRNA引起的密码子GGG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-6),及延长氨酰tRNA(AAtR-115～AAtR-118中任一种,及AAtR-109),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1686] 以使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243(Pep-5))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:245(Pep-7))。

[1687] 进行了评价由具有反密码子acc的tRNA引起的密码子GGG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-6),及延长氨酰tRNA(AAtR-119～AAtR-122中任一种,及AAtR-109),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1688] 以使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:243(Pep-5))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:246(Pep-8))。

[1689] 进行了评价由具有反密码子acc的tRNA引起的密码子GGG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-6),及延长氨酰tRNA(AAtR-123～AAtR-126中任一种,及AAtR-127),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1690] 以使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:247(Pep-9))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu(SEQ ID No:248(Pep-10))。

[1691] 进行了评价基于具有反密码子agg的tRNA引起的密码子CCG的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-4),及延长氨酰tRNA(AAtR-21～AAtR-30中任一种,及AAtR-130),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1692] 以使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:249(Pep-11))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242(Pep-4))。

[1693] 进行了评价由具有反密码子cgg的tRNA引起的密码子CCU的误读的量的翻译实验。使用了模板mRNA(MR-3),及延长氨酰tRNA(AAtR-31～AAtR-40中任一种,及AAtR-129),除此以外,按照上述翻译条件1进行翻译。

[1694] 以使得作为正确阅读时的翻译产物为BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:

Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:249(Pep-11))的方式设计了上述模板mRNA。如果发生由氨酰tRNA引起的误读,则翻译成BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly(SEQ ID No:242(Pep-4))。

[1695] 实施例7翻译肽的分析

[1696] 将由实施例6-1～6-5的翻译反应得到的翻译产物溶液稀释10倍,使用LC-FLR-MS的装置进行分析。根据得到的MS数据鉴定成为对象的翻译肽的保留时间,通过定量符合保留时间的荧光峰,由此对肽翻译量进行了评价。需要说明的是,在没有另行说明的情况下,定量评价为以实施例3合成的LCT-67作为标准品制作标准曲线,通过相对定量而算出含量。在没有另行说明的情况下,按照下述表5的方法1的条件分析了LC-MS。另外,基于求出的肽翻译量,使用下式算出了误读肽相对于目标物的比例(%)。在本说明书中,有时将正确阅读时得到的肽称正确阅读时的翻译产物、目标物。

[1697] [数学式1]

[1698] $$\text{误读肽相对于目标物的比例}(\%)=\frac{\text{发生误读时得到的肽的翻译量}(\mu M)}{\text{正确阅读时得到的肽的翻译量}(\mu M)}\times 100$$

[1699] 分析条件

[1700] [表5]

[1701]

	方法 1	方法 2
装置	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof
柱	waters BEHC18(2.1x50mm, ϕ1.7μm)	waters BEHC18(2.1x100mm, ϕ1.7μm)
移动相	A=0.1% FA 用 H_2O B=0.1% FA 用 CH_3CN	A=0.1% FA 用 H_2O B=0.1% FA 用 CH_3CN
梯度 (%B)	0-0.2min=10% 0.2-3.6min=98% 3.6-4.0min=10%	0-0.4min=60% 0.4-9.0min=98% 9.0-10min=60%
流速 (ml/min)	0.5	0.5
柱温	40	40
荧光测定波长 (Ex/Em)	491nm/515nm	491nm/515nm
Ms 模式	ESI-	ESI-

[1702] 结果

[1703] 评价后的结果,存在对由改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA引起的密码子

的误读的比例而言，当32,33,37及38位的碱基的组合为Ser5序列，Ala1B序列，及Phe序列的情况下增加，当为Pro3序列，Pro2序列，Ala2序列，Leu2序列，Arg3序列及Val2序列的情况下减少的倾向(图1～图6，表6～表11)。其中，当为Pro3序列，Pro2序列，Ala2序列及Leu2序列的情况下，减少的倾向较大。关于改变tRNA体的情况，对误读的位次没有影响(图7～图10，表12～表15)。关于改变评价的密码子及改变反密码子的组合的情况，确认了通过将tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合改变为特定的那些而造成的密码子误读的降低效果(图11～图13，表16～表18)。对于改变氨基酰化的氨基酸的情况，也确认了将tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合改变为特定的那些而造成的误读降低效果(图14～图18，表21～表25)。由此表明，通过改变tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合，可降低密码子的误读。另外，关于涉及tRNA的32,33,37及38位多个碱基的组合，弄清了发生密码子误读的容易度，能够进行tRNA序列的定制，所述tRNA序列与使用的tRNA配合，将氨基酸的翻译量保持为一定以上，并且降低密码子的误读。

[1704] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有agg或cgg的tRNA引起的，CCG密码子的分读的翻译结果示于下表。与不改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA Glu2(AAtR-24)相比，在将上述碱基的组合改变为Pro2序列，Leu2序列，Ala2序列，或Pro3序列的tRNA(AAtR-27～30)中，观察到密码子误读的降低(图1)。

[1705] [表6]

[1706]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μM)
AATR-21	MR-4	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.58
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.75
AATR-22		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.51
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.66
AATR-23		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.58
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.05
AATR-24		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.36
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.93
AATR-25		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.48
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.19
AATR-26		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.44
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.15
AATR-27		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.25
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.32
AATR-28		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.35
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.41
AATR-29		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.11
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.89
AATR-30		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.11
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.60

[1707] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有cgg或agg的tRNA引起的，CCU密码子的分读的翻译结果示于下表。与不改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA Glu2(AAtR-34)相比，在将上述碱基的组合改变为Phe序列，Arg3序列，Val2序列，Pro2序列，Leu2序列，Ala2序列，或Pro3序列改变为的tRNA(AAtR33及AAtR35～40)中，观察到密码子误读的降低，特别是在改变为Pro2序列，Leu2序列，Ala2序列，或Pro3序列的tRNA中，密码子误读的降低效果较高(图2)。

[1708] [表7]

[1709]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-31	MR-3	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.44
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.96
AATR-32		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.39
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.70
AATR-33		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.35
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.45
AATR-34		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.32
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.05
AATR-35		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.21
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.94
AATR-36		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.25
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.40
AATR-37		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.13
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.42
AATR-38		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.14
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.68
AATR-39		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.07
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	3.00
AATR-40		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.06
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.60

[1710] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有acc或ccc的tRNA引起的,GGG密码子的分读的翻译结果示于下表。与不改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA Glu2(AAtR-44)相比,在将上述碱基的组合改变为Arg3序列,Phe序列,Val2序列,Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,或Pro3序列改变为的tRNA(AAtR-43及AAtR45～50)中,观察到密码子误读的降低,特别是在改变为Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,或Pro3序列的tRNA中,密码子误读的降低效果较高(,图3)。

[1711] [表8]

[1712]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 μM)
AATR-41	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.91
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.51
AATR-42		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.68
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.48
AATR-43		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.57
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.29
AATR-44		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.77
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.79
AATR-45		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.58
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.31
AATR-46		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.34
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.53
AATR-47		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.05
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.23
AATR-48		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.07
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.68
AATR-49		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.08
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.15
AATR-50		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.07
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.23

[1713] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有ccc或acc的tRNA引起的,GGU密码子的分读的翻译结果示于下表。在不改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA Glu2(AAtR-54)中,虽然由密码子的误读引起的肽翻译量也较低,但在将上述碱基的组合改变为Phe序列,Ala1B序列,Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,Pro3序列,Arg3序列,或Val2序列的tRNA(AAtR-52、AAtR-53及AAtR-55～60)中,由密码子的误读引起的肽翻译量也保持降

低,观察到与上述实施例相同的倾向(图4)。

[1714] [表9]

[1715]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μM)
AATR-51	MR-5	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.15
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.54
AATR-52		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.43
AATR-53		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.04
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.97
AATR-54		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.04
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.40
AATR-55		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.57
AATR-56		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.22
AATR-57		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.01
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.39
AATR-58		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.63
AATR-59		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.71
AATR-60		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.55

[1716] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有cag或aag的tRNA引起的,CUG密码子的翻译结果示于下表。与不改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA Glu2(AAtR-4)相比,将源自上述碱基的组合改变为Pro2序列,或Pro3序列的tRNA(AAtR-8及9)中,观察到密码子误读的降低,在Ala2序列中,由密码子的误读引起的肽翻译量也保持降低(图5)。

[1717] [表10]

[1718]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量(μM)
AATR-1	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.28
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.85
AATR-2		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.35
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.86
AATR-3		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.26
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.92
AATR-4		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.62
AATR-5		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.80
AATR-6		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.17
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.82
AATR-7		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.18
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.56
AATR-8		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.06
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	2.27
AATR-9		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.05
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.85
AATR-10		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.67

[1719] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有aag或cag的tRNA引起的,CUU密码子的分读的翻译结果示于下表。在不改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA Glu2(AAtR-14)中,虽然由密码子的误读引起的肽翻译量也较低,但在将源自上述碱基的组合改变为Phe序列,Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,Pro3序列,Arg3序列,或Val2序列的tRNA

(AAtR-13及AAtR-15～20)中,由密码子的误读引起的肽翻译量也保持降低,观察到与上述实施例相同的倾向(图6)。

[1720] [表11]

[1721]

模板mRNA序列	模板mRNA序列	翻译肽化合物	(μM)
AATR-11	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.61
AATR-12		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.10
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.62
AATR-13		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.74
AATR-14		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.51
AATR-15		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.56
AATR-16		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.48
AATR-17		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.54
AATR-18		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.65
AATR-19		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.94
AATR-20		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.62

[1722] 这些结果表明,在tRNA的32,33,37及38位的碱基的组合为Ser5序列、Ala1B序列的情况下,误读肽相对于目标物的比例高。为了证实对于作为上述碱基的组合具有Ser5序列的tRNA,通过改变32,33,37及38位的碱基的组合可降低密码子的误读,进行以下实验。

[1723] 作为32,33,37及38位的碱基的组合为Ser5序列的tRNA,选择tRNA AsnE2。将由具有tRNA(AsnE2)体,改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有aag或cag的tRNA引起的,CUG密码子的分读的翻译结果示于下表。与不改变32,33,37及38位的碱基的组合的tRNA(AsnE2)(AAtR-81)相比,将源自上述碱基的组合改变为Arg3序列,Val2序列,Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,或Pro3序列的tRNA(AAtR-85～90)中,观察到密码子误读的降低,特别是在改变为Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,或Pro3序列改变为的tRNA中,密码子误读的降低效果较高(图7)。

[1724] [表12]

[1725]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-81	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.69
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.60
AATR-82		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.77
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.58
AATR-83		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.84
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.63
AATR-84		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.71
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.59
AATR-85		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.57
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.63
AATR-86		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.57
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.65
AATR-87		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.19
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.64
AATR-88		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.30
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.57
AATR-89		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.07
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.61
AATR-90		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.70

[1726] 将由具有tRNA(AsnE2)体，改变32，33，37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有cag或aag的tRNA引起的，CUU密码子的分读的翻译结果示于下表。与不改变32，33，37及38位的碱基的组合的tRNA(AsnE2)(AAtR-91)相比，将源自上述碱基的组合改变为Arg3序列，Val2序列，Pro2序列，Leu2序列，Ala2序列，或Pro3序列的tRNA(AAtR-95～100)中，观察到密码子误读的降低，特别是在改变为Pro2序列，Leu2序列，Ala2序列，或Pro3序列改变为的tRNA中，密码子误读的降低效果较高(图8)。

[1727] [表13]

[1728]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-91	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.36
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.69
AATR-92		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.49
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.65
AATR-93		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.40
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.68
AATR-94		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.39
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.66
AATR-95		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.74
AATR-96		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.14
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.74
AATR-97		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.05
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.79
AATR-98		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.07
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.84
AATR-99		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.04
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.83
AATR-100		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.04
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.84

[1729] 以上结果表明，即使是容易产生密码子误读的tRNA，通过改变32，33，37及38位的碱基的组合也能够降低密码子的误读。

[1730] 验证了在其它tRNA体中的密码子误读降低效果。将由具有tRNA(Asp1)体，改变32，33，37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有aag或cag的tRNA引起的，CUG密码子的分读的翻译结果示于下表。与不改变32，33，37及38位的碱基的组合的tRNA(Asp1)(AAtR-64)相

比，将源自上述碱基的组合改变为Arg3序列，Val2序列，Pro2序列，Leu2序列，Ala2序列，或Pro3序列的tRNA(AAtR-65～70)中，观察到密码子误读的降低(图9)。

[1731] [表14]

[1732]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-61	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.52
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-62		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.48
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.33
AATR-63		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.35
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.42
AATR-64		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.27
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.40
AATR-65		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.22
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-66		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.18
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.29
AATR-67		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.15
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.22
AATR-68		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.28
AATR-69		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.15
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.23
AATR-70		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.33

[1733] 将由具有tRNA(Asp1)体，改变32，33，37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有cag或aag的tRNA引起的，CUU密码子的分读的翻译结果示于下表。虽然在不改变32，33，37及38位的碱基的组合的tRNA(Asp1)(AAtR-74)中由密码子的误读引起的肽翻译量也较低，但在将源自上述碱基的组合改变为Phe序列，Val2序列，Pro2序列，Leu2序列，Ala2序列，或Pro3序列的tRNA(AAtR-76～80)中也使密码子误读降低，观察到与上述实施例相同的倾向(图10)。

[1734] [表15]

[1735]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-71	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.12
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.44
AATR-72		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.11
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.45
AATR-73		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.40
AATR-74		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.38
AATR-75		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-76		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-77		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.07
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.29
AATR-78		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-79		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.30
AATR-80		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.26

[1736] 验证了在使用与上述实施例中使用的密码子在第三个字母的碱基不同的密码子的情况下，误读降低的效果。将由改变32，33，37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有

ucc或acc的tRNA引起的，GGA密码子的分读的翻译结果示于下表。将具有反密码子acc的tRNA的32，33，37及38位的碱基的组合改变为Leu2序列或Pro3序列时，密码子GGA的误读降低了(图11)。

[1737] [表16]

[1738]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-44	MR-7	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.55
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.79
AATR-47		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.14
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.20
AATR-48		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.15
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.35

[1739] 将由改变32，33，37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有ucc或gcc的tRNA引起的，GGA密码子的分读的翻译结果示于下表。将具有反密码子gcc的tRNA的32，33，37及38位的碱基的组合改变为Leu2序列或Pro3序列时，密码子GGA的误读降低了(图12)。

[1740] [表17]

[1741]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-101	MR-7	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.87
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.97
AATR-102		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.16
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.05
AATR-103		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.24
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.18

[1742] 将由改变32，33，37及38位的碱基的组合，在反密码子处具有ccc或gcc的tRNA引起的，GGG密码子的分读的翻译结果示于下表。将具有反密码子gcc的tRNA的32，33，37及38位的碱基的组合改变为Leu2序列或Pro3序列时，密码子GGG的误读降低了(图13)。

[1743] [表18]

[1744]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-101	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.22
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.38
AATR-102		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.13
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.47
AATR-103		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.12
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.46

[1745] 以上结果表明，不拘于密码子的第三个字母的碱基的种类，都可观察到密码子误读的降低效果。这表明，即使在采用密码子盒内的任意密码子的情况下，也可得到基于本公开的密码子误读降低效果。将密码子重编程以使得不同种类的氨基酸在相同密码子盒内复数分配时，与使用的密码子无关而可得到本公开的效果，这可以提高重编程的自由度而有用。

[1746] 在有无赖胞苷修饰的条件下，进行了由改变32，33，37及38位的碱基的组合，而在反密码子处具有aag，uag或cag的tRNA引起的CUU，CUA或CUG密码子的分读评价。作为tRNA体使用了tRNA(Asp1+Leu2)及tRNA(AsnE2+Leu2)。将翻译结果示于下表。结果显示，能够与对于tRNA的修饰技术组合。需要说明的是，定量评价为制作以LCT-12作为标准品的标准曲线，通过相对定量算出含量。LC-MS按照表5的方法2条件进行分析。

[1747] [表19]

[1748]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
AATR-131	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.14
AATR-132		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.04
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-131		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-133		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-131	MR-8	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-132		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-131		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-133		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.39
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.03
AATR-131	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-132		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-131		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-133		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.15

[1749] [表20]

[1750]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
AATR-135	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.18
AATR-136		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.22
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-135		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.26
AATR-137		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-135	MR-8	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-136		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.45
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-135		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-137		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.64
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-135	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-136		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.12
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.34
AATR-135		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-137		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.45

[1751] 改变氨基酸的种类而验证了密码子误读的降低效果。将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有acc或ccc的tRNA引起的,GGG密码子的分读的翻译结果示于下表。在将32,33,37及38位的碱基的组合改变为Leu2序列,Ala2序列,或Pro3序列的tRNA中,观察到密码子误读的降低(图14)。

[1752] [表21]

[1753]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量 (μM)
AATR-115	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.56
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.47
AATR-116		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.06
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.24
AATR-117		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.08
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.18
AATR-118		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.07
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.18

[1754] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有acc或ccc的tRNA引起的,GGG密码子的分读的翻译结果示于下表。在将32,33,37及38位的碱基的组合改变为Leu2序列,Ala2序列或Pro3序列的tRNA中,观察到密码子误读的降低(图15)。

[1755] [表22]

[1756]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-119	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.28
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.95
AATR-120		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.16
AATR-121		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.04
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.29
AATR-122		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.11

[1757] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有acc或ccc的tRNA引起的,GGG密码子的分读的翻译结果示于下表。在将32,33,37及38位的碱基的组合改变为Leu2序列,Ala2序列,或Pro3序列的tRNA中,观察到密码子误读的降低(图16)。

[1758] [表23]

[1759]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-123	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.28
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.94
AATR-124		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.81
AATR-125		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.05
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.95
AATR-126		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.88

[1760] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有cgg或agg的tRNA引起的,CCG密码子的分读的翻译结果示于下表。在将32,33,37及38位的碱基的组合改变为Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,或Pro3序列的tRNA中,观察到密码子误读的降低(图17)。

[1761] [表24]

[1762]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-21	MR-4	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.57
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.37
AATR-22		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.43
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.94
AATR-23		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.53
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.45
AATR-24		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.32
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.14
AATR-25		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.27
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.72
AATR-26		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.36
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.45
AATR-27		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.18
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.04
AATR-28		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.25
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.50
AATR-29		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.12
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.59
AATR-30		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.10
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.07

[1763] 将由改变32,33,37及38位的碱基的组合,在反密码子处具有agg或cgg的tRNA引起的,CCU密码子的分读的翻译结果示于下表。将在32,33,37及38位的碱基的组合改变为Phe序列,Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,Pro3序列,Arg3序列或Val2序列的tRNA中,可发现密码子误读的降低,其中在Pro2序列,Leu2序列,Ala2序列,及Pro3序列中,该效果明显(图18)。

[1764] [表25]

[1765]

氨酰tRNA	模板mRNA序列	翻译肽化合物	翻译量（μM）
AATR-31	MR-3	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.35
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.15
AATR-32		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.33
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.90
AATR-33		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.26
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.41
AATR-34		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.22
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.92
AATR-35		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.19
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.26
AATR-36		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.18
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.07
AATR-37		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.09
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.05
AATR-38		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.09
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.24
AATR-39		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.07
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.38
AATR-40		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.06
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.99

[1766] 以上结果表明，改变与tRNA结合的氨基酸的种类也可得到同样的效果。由此表明，不拘于与tRNA结合的氨基酸的种类，也不拘于氨基酸的组合而可得到降低密码子的误读的效果。

[1767] 上述发明中出于帮助理解清楚的目的而详细记载了实例及例示，但本说明书中的记载及例示不应解释为对本发明的范围进行任何限定。本说明书中引用的全部的专利文献及科学文献的公开，均以其全部通过参考而明确地并入本说明书。

[1768] 工业实用性

[1769] 通过使用本公开的翻译用组合物及肽的制备方法等，从核酸进行翻译而合成肽时，能够降低基于tRNA密码子的误读引起的误译为非预期氨基酸的比例。本公开的组合物及方法等特别在肽的翻译合成领域中有用。

<110> 中外制药株式会社

<120> 翻译用组合物及肽的制备方法

<130> C1-A2016P

<150> PCT/JP2019/051241
<151> 2019-12-26

<150> JP 2020-109292
<151> 2020-06-25

<160> 324

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 1
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaagaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 2
<211> 95
<212> DNA
[0001] <213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 2
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaagac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 3
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 3
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaagaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 4
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 4
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaagac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 5
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>

<223> 人工合成的序列
<400> 5
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaagga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 6
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 6
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaagat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 7
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 7
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaaggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 8
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 8

[0002] ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaagga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 9
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 9
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccataaggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 10
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 10
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccataagat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 11
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 11
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcagaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 12

<210> 95
<211> DNA
<212> 人工序列 (Artificial sequence)
<213>
<220> 人工合成的序列
<223>
<400> 12
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcagac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 13
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 13
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcagaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 14
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 14
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcagac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 15
<211> 95
<212> DNA
[0003] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 15
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcagga 60

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 16
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 16
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcagat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 17
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 17
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcaggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 18
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>

<223> 人工合成的序列
<400> 18
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcagga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 19
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 19
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccatcaggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 20
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 20
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccatcagat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 21
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 21
[0004] ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaggaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 22
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 22
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaggac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 23
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 23
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaggaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 24
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 24
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaggac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 25

<210> 95
<211> DNA
<212> 人工序列 (Artificial sequence)
<213>
<220> 人工合成的序列
<223>
<400> 25
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaggga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 26
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 26
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaggat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 27
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 27
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttagggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 28
<211> 95
<212> DNA
[0005] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 28
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaggga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 29
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 29
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccatagggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 30
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 30
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccataggat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 31
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 31
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcggaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 32
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 32
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcggac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 33
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 33
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcggaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 34
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 34
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcggac 60
[0006] ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 35
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 35
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcggga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 36
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 36
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcggat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 37
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 37
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcgggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95

<210> 38

<210> 95
<211> DNA
<212> 人工序列 (Artificial sequence)
<213>
<220> 人工合成的序列
<223>
<400> 38
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcggga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 39
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 39
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccatcgggt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 40
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 40
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccatcggat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 41
<211> 95
<212> DNA
[0007] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 41
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaccaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 42
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 42
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaccac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 43
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 43
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaccaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 44
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 44
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaccac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 45
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 45
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctaccga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 46
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 46
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaccat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 47
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 47
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaccgt 60

[0008]

ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 48
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 48
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttaccga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 49
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 49
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccataccgt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 50
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 50
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccataccat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 51

<210> 95
<211> DNA
<212> 人工序列 (Artificial sequence)
<213>
<220> 人工合成的序列
<223>
<400> 51
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcccaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 52
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 52
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcccac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 53
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 53
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcccaa 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 54
<211> 95
<212> DNA
[0009] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 54
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcccac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 55
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 55
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctcccga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 56
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 56
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcccat 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 57
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 57
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcccgt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 58
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 58
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttcccga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 59
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 59
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccatcccgt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 60
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 60
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccatcccat 60
[0010] ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 61
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 61
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctaagaa 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 62
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 62
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttaagac 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 63
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 63
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttaagaa 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 64
<211> 96

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 64
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctaagac 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 65
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 65
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctaagga 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 66
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 66
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttaagat 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 67
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0011] <220>
<223> 人工合成的序列
<400> 67
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttaaggt 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 68
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 68
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttaagga 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 69
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 69
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcataaggt 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96

<210> 70
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 70
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcataagat 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 71
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 71
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctcagaa 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 72
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 72
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttcagac 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 73
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 73
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttcagaa 60
[0012] gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 74
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 74
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctcagac 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 75
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 75
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcctcagga 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 76
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 76
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttcagat 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 77
<211> 96

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 77
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttcaggt 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 78
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 78
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcttcagga 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 79
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 79
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcatcaggt 60

gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 80
<211> 96
<212> DNA
[0013] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 80
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgcatcagat 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 81
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 81
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactaagaat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 82
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 82
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattaagact 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 83
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 83
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattaagaat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 84
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 84
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactaagact 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 85
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 85
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactaaggat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 86
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 86
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattaagatt 60
[0014] ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 87
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 87
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattaaggtt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 88
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 88
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattaaggat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 89
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 89
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gaataaggtt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 90
<211> 95

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 90
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gaataagatt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 91
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 91
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactcagaat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 92
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 92
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattcagact 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 93
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0015] <220>
<223> 人工合成的序列
<400> 93
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattcagaat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 94
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 94
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactcagact 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 95
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 95
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gactcaggat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 96
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 96

ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattcagatt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 97
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 97
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattcaggtt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 98
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 98
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gattcaggat 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 99
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 99
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gaatcaggtt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95

[0016]

<210> 100
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 100
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gaatcagatt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 101
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 101
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccctgccac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 102
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 102
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttgccgt 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 103
<211> 95
<212> DNA

<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 103
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gccttgccga 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 104
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 104
ggcgtaatac gactcactat agtccccttc gtctagaggc ccaggacacc gcccttccac 60
ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaggg gacgc 95
<210> 105
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 105
ggcgtaatac gactcactat aggcggggtg gagcagcctg gtagctcgtc gggctcataa 60
cccgaagatc gtcggttcaa atccggcccc cgcaac 96
<210> 106
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
[0017] <223> 人工合成的序列
<400> 106
ggcgtaatac gactcactat aggagcggta gttcagtcgg ttagaatacc tgctttaggt 60
gcaggggtc gcgggttcga gtcccgtccg ttccgc 96
<210> 107
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 107
ggcgtaatac gactcactat aggctctgta gttcagtcgg tagaacggcg gatttaggtt 60
ccgtatgtca ctggttcgag tccagtcaga gccgc 95
<210> 108
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 108
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaagaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 109
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 109
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaagacg gcgguaacag ggguucgaau 60

ccccuagggg acgc 74
<210> 110
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 110
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaagaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 111
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 111
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaagacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 112
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 112
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaaggag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 113
[0018] <211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 113
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaagaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 114
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 114
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaaggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 115
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 115
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaaggag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 116
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 116
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccauaaggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 117
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 117
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccauaagaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 118
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 118
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccucagaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 119
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
[0019] 〈400〉 119
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucagacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 120
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 120
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucagaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 121
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 121
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccucagacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 122
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 122
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccucaggag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74

<210> 123
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 123
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucagaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 124
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 124
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucaggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 125
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 125
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucaggag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 126
<211> 74
[0020] <212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 126
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaucaggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 127
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 127
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaucagaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 128
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 128
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaggaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 129
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>

〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 129
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaggacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 130
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 130
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaggaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 131
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 131
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaggacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 132
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 132
[0021] gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg cccuagggag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 133
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 133
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaggaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 134
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 134
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuagggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 135
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 135
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuagggag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 136

〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 136
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccauagggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 137
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 137
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccauaggaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 138
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 138
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg cccucggaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 139
〈211〉 74
〈212〉 RNA
[0022] 〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 139
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucggacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 140
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 140
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucggaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 141
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列
〈400〉 141
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg cccucggacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
〈210〉 142
〈211〉 74
〈212〉 RNA
〈213〉 人工序列（Artificial sequence）
〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 142
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccucgggag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 143
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 143
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucggaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 144
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 144
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucgggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 145
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 145
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucgggag gcgguaacag ggguucgaau 60
[0023] ccccuagggg acgc 74
<210> 146
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 146
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaucgggug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 147
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 147
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaucggaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 148
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 148
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaccaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 149
<211> 74

<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 149
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaccacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 150
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 150
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaccaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 151
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 151
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaccacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 152
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0024] <220>
<223> 人工合成的序列
<400> 152
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuaccgag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 153
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 153
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaccaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 154
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 154
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaccgug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 155
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 155

gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuuaccgag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 156
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 156
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccauaccgug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 157
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 157
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccauaccaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 158
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 158
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg cccucccaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
[0025] <210> 159
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 159
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucccacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 160
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 160
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucccaag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 161
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 161
gucccc uucg ucuagaggcc caggacaccg cccucccacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 162
<211> 74
<212> RNA

<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 162
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccucccgag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 163
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 163
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucccaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 164
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 164
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucccgug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 165
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
[0026] <223> 人工合成的序列
<400> 165
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuucccgag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 166
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 166
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaucccgug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 167
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 167
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaucccaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 168
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 168
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccuaagaag cagggggucg cggguucgag 60

ucccguccgu uccgc 75
<210> 169
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 169
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuuaagacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 170
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 170
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuuaagaag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 171
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 171
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccuaagacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 172
[0027] <211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 172
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccuaaggag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 173
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 173
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuuaagaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 174
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 174
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuuaaggug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 175
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）

<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 175
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuuaaggag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 176
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 176
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcauaaggug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 177
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 177
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcauaagaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 178
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
[0028] <400> 178
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccucagaag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 179
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 179
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuucagacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 180
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 180
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuucagaag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 181
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 181
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccucagacg cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75

<210> 182
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 182
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccucaggag caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 183
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 183
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuucagaug caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 184
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 184
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuucaggug caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 185
<211> 75
[0029] <212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 185
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuucaggag caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 186
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 186
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcaucaggug caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 187
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 187
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcaucagaug caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 188
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>

<223> 人工合成的序列
<400> 188
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acuaagaauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 189
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 189
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuaagacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 190
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 190
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuaagaauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 191
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 191
[0030] ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acuaagacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 192
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 192
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acuaaggauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 193
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 193
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuaagauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 194
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 194
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuaagguuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 195

<210> 74
<211> RNA
<212> 人工序列 (Artificial sequence)
<213> 人工合成的序列
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 195
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuaaggauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 196
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 196
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg aauaagguuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 197
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 197
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg aauaagauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 198
<211> 74
<212> RNA
[0031] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 198
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acucagaauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 199
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 199
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucagacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 200
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 200
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucagaauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 201
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 201
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acucagacuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 202
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 202
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acucaggauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 203
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 203
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucagauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74

<210> 204
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 204
[0032] ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucagguuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 205
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 205
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auucaggauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 206
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 206
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg aaucagguuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 207
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 207
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg aaucagauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 208

<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 208
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccugccacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 209
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 209
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuugccgug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 210
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 210
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuugccgag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 211
<211> 74
<212> RNA
[0033] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 211
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuuccacg gcgguaacag ggguucgaau 60

ccccuagggg acgc 74
<210> 212
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 212
ggcggggugg agcagccugg uagcucgucg ggcucauaac ccgaagaucg ucgguucaaa 60
uccggccccc gcaac 75
<210> 213
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 213
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuuuaggug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 214
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>

<223> 人工合成的序列
<400> 214
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auuuagguuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 215
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n = 赖胞苷（2-赖氨酰胞苷）
<400> 215
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuunaggug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 216
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> n = 赖胞苷（2-赖氨酰胞苷）
<400> 216
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auunagguuc cguaugucac ugguucgagu 60
[0034] ccagucagag ccgc 74
<210> 217
<211> 34
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 217
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuu 34
<210> 218
<211> 40
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 218
aggugcaggg ggucgcgggu ucgagucccg uccguuccgc 40
<210> 219
<211> 33
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 219
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auu 33
<210> 220
<211> 40
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>

<223> 人工合成的序列
<400> 220
agguuccgua ugucacuggu ucgaguccag ucagagccgc 40
<210> 221
<211> 97
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 221
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggtttt cttattattc cgattggtta agcttcg 97
<210> 222
<211> 97
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 222
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggtttt ctgattattc cgattggtta agcttcg 97
<210> 223
<211> 97
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 223
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
[0035] tattggtttt cctattattg ctattggtta agcttcg 97
<210> 224
<211> 97
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 224
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggtttt ccgattattg ctattggtta agcttcg 97
<210> 225
<211> 97
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 225
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattctattt ggtattattc cgattctata agcttcg 97
<210> 226
<211> 97
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 226
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattctattt gggattattc cgattctata agcttcg 97
<210> 227
<211> 97

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 227
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattctattt ggaattattc cgattctata agcttcg 97
<210> 228
<211> 97
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 228
ggcgtaatac gactcactat agggttaact ttaagaagga gatatacata tgacttttat 60
tattggtttt ctaattattc cgattggtta agcttcg 97
<210> 229
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 229
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auugguuuuc uuauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76
<210> 230
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

[0036]

<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 230
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auugguuuuc ugauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76
<210> 231
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 231
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auugguuuuc cuauuauugc 60
uauugguuaa gcuucg 76
<210> 232
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 232
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auugguuuuc cgauuauugc 60
uauugguuaa gcuucg 76
<210> 233
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 233

ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auucuauuug guauuauucc 60
gauucuauaa gcuucg 76
<210> 234
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 234
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auucuauuug ggauuauucc 60
gauucuauaa gcuucg 76
<210> 235
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 235
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auucuauuug gaauuauucc 60
gauucuauaa gcuucg 76
<210> 236
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 236
ggguuaacuu uaagaaggag auauacauau gacuuuuauu auugguuuuc uaauuauucc 60
gauugguuaa gcuucg 76

[0037] <210> 237
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<400> 237
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Ile Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 238
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<400> 238
Xaa Thr Ile Phe Pro Gly Phe Ile Ile Thr Thr Gly Thr Gly Thr Gly
1 5 10 15
Thr Gly Ala

<210> 239
<211> 13

<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = MeHph
<400> 239
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 240
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = SPh2Cl

[0038]

<400> 240
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 241
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = MeHph
<400> 241
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Ala Ile Gly
1 5 10
<210> 242
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = SPh2Cl
<400> 242
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Ala Ile Gly
1 5 10
<210> 243
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = MeHPh
<400> 243
Xaa Thr Phe Ile Ile Leu Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Leu
1 5 10
<210> 244
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
[0039] <223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = SPh2Cl
<400> 244
Xaa Thr Phe Ile Ile Leu Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Leu
1 5 10
<210> 245
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Pic2
<400> 245
Xaa Thr Phe Ile Ile Leu Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Leu
1 5 10
<210> 246

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = MeG
<400> 246
Xaa Thr Phe Ile Ile Leu Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Leu
1 5 10
<210> 247
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)

[0040] <223> Xaa = nBuG
<400> 247
Xaa Thr Phe Ile Ile Leu Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Leu
1 5 10
<210> 248
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = dA
<400> 248
Xaa Thr Phe Ile Ile Leu Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Leu
1 5 10
<210> 249
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)

<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = MeG
<400> 249
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Ala Ile Gly
1 5 10
<210> 250
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = nBuG
<400> 250
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 251
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

[0041]

<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = SPh2Cl
<400> 251
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10
<210> 252
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = BdpF
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = dA
<400> 252
Xaa Thr Phe Ile Ile Gly Phe Xaa Ile Ile Pro Ile Gly
1 5 10

<210> 253
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Glu2 体 (-CA) (32-38 = n)
<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(39)
<223> n是a, c, g或u
<400> 253
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccnnnnnnng gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 254
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Asp1 体 (-CA) (32-38 = n)
<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(39)
<223> n是a, c, g或u
<400> 254
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcnnnnnnng caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 255
<211> 74
<212> RNA
[0042] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA AsnE2 体 (-CA) (32-38 = n)
<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(38)
<223> n是a, c, g或u
<400> 255
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg annnnnnnuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 256
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Glu2+Leu2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 256
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuunnngug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 257
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Glu2+Pro3) 体 -CA
<220>

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 257
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuunnngag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 258
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Glu2+Pro2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 258
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaunnngug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 259
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Glu2+Ala2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
[0043] <400> 259
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccaunnnaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 260
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Glu2+Val2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 260
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg ccuunnnaug gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 261
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Glu2+Arg3) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 261
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccunnngag gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgc 74
<210> 262

<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Asp1+Leu2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 262
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuunnngug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 263
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Asp1+Pro3) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 263
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuunnngag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 264
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0044] <220>
<223> tRNA(Asp1+Pro2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 264
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcaunnngug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 265
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Asp1+Ala2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 265
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcaunnnaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 266
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Asp1+Val2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature

<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 266
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gcuunnnaug cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 267
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(Asp1+Arg3) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 267
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccunnngag cagggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgc 75
<210> 268
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(AsnE2+Leu2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n是a, c, g或u
[0045] <400> 268
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auunnnguuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 269
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(AsnE2+Pro3) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n是a, c, g或u
<400> 269
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auunnngauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 270
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(AsnE2+Pro2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n是a, c, g或u
<400> 270
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg aaunnnguuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 271

<210> 74
<211> RNA
<212> 人工序列 (Artificial sequence)
<213>
<220>
<223> tRNA(AsnE2+Ala2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n是a, c, g或u
<400> 271
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg aaunnnauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 272
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA(AsnE2+Val2) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n是a, c, g或u
<400> 272
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg auunnnauuc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 273
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
[0046] <220>
<223> tRNA(AsnE2+Arg3) 体 -CA
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n是a, c, g或u
<400> 273
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acunnngauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgc 74
<210> 274
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Ala1B
<400> 274
ggggcuauag cucagcuggg agagcgccug cuuugcacgc aggaggucug cgguucgauc 60
ccgcauagcu ccacca 76
<210> 275
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Ala2
<400> 275
ggggcuauag cucagcuggg agagcgcuug cauggcaugc aagaggucag cgguucgauc 60
ccgcuuagcu ccacca 76
<210> 276
<211> 77
<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Arg2
<400> 276
gcauccguag cucagcugga uagaguacuc ggcuacgaac cgagcggucg gagguucgaa 60
uccucccgga ugcacca 77
<210> 277
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Arg3
<400> 277
gcgcccguag cucagcugga uagagcgcug cccuccggag gcagaggucu cagguucgaa 60
uccugucggg cgcgcca 77
<210> 278
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Arg4
<400> 278
gcgcccuuag cucaguugga uagagcaacg accuucuaag ucgugggccg cagguucgaa 60
uccugcaggg cgcgcca 77
<210> 279
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
[0047] <223> tRNA Arg5
<400> 279
guccucuuag uuaaauggau auaacgagcc ccuccuaagg gcuaauugca gguucgauuc 60
cugcagggga cacca 75
<210> 280
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Asn
<400> 280
uccucuguag uucagucggu agaacggcgg acuguuaauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag gagcca 76
<210> 281
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Asp1
<400> 281
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccugucacg caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77
<210> 282
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Cys
<400> 282
ggcgcguuaa caaagcgguu auguagcgga uugcaaaucc gucuaguccg guucgacucc 60

ggaacgcgcc ucca 74

<210> 283
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> tRNA fMet1
<400> 283
cgcggggugg agcagccugg uagcucgucg ggcucauaac ccgaaggucg ucgguucaaa 60
uccggccccc gcaacca 77

<210> 284
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> tRNA fMet2
<400> 284
cgcggggugg agcagccugg uagcucgucg ggcucauaac ccgaagaucg ucgguucaaa 60
uccggccccc gcaacca 77

<210> 285
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> tRNA Gln1
<400> 285
uggguaucg ccaagcggua aggcaccggu uuuugauacc ggcauucccu gguucgaauc 60
cagguacccc agcca 75

[0048]

<210> 286
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> tRNA Gln2
<400> 286
uggguaucg ccaagcggua aggcaccgga uucugauucc ggcauuccga gguucgaauc 60
cucguacccc agcca 75

<210> 287
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> tRNA Glu2
<400> 287
gucccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccuuucacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76

<210> 288
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）
<220>
<223> tRNA Gly1
<400> 288
gcgggcguag uucaauggua gaacgagagc uucccaagcu cuauacgagg guucgauucc 60
cuucgcccgc ucca 74

<210> 289
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列（Artificial sequence）

<220>
<223> tRNA Gly2
<400> 289
gcgggcaucg uauaauggcu auuaccucag ccuuccaagc ugaugaugcg gguucgauuc 60
ccgcugcccg cucca 75
<210> 290
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Gly3
<400> 290
gcgggaauag cucaguuggu agagcacgac cuugccaagg ucggggucgc gaguucgagu 60
cucguuuccc gcucca 76
<210> 291
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA His
<400> 291
guggcuauag cucaguuggu agagcccugg auugugauuc caguugucgu ggguucgaau 60
cccauuagcc acccca 76
<210> 292
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Ile1
[0049] <400> 292
aggcuuguag cucagguggu uagagcgcac cccugauaag ggugaggucg gugguucaag 60
uccacucagg ccuacca 77
<210> 293
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Ile2
<400> 293
ggccccuuag cucagugguu agagcaggcg acucauaauc gcuuggucgc ugguucaagu 60
ccagcagggg ccacca 76
<210> 294
<211> 87
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Leu1
<400> 294
gcgaaggugg cggaauuggu agacgcgcua gcuucaggug uuaguguucu uacggacgug 60
gggguucaag ucccccccccu cgcacca 87
<210> 295
<211> 87
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Leu2
<400> 295
gccgaggugg uggaauuggu agacacgcua ccuugaggug guagugccca auagggcuua 60
cggguucaag ucccguccuc gguacca 87

<210> 296
<211> 85
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Leu3
<400> 296
gcgggagugg cgaaauuggu agacgcacca gauuuagguu cuggcgccgc aaggugugcg 60
aguucaaguc ucgccucccg cacca 85
<210> 297
<211> 87
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Leu4
<400> 297
gcccggaugg uggaaucggu agacacaagg gauuuaaaau cccucggcgu ucgcgcugug 60
cggguucaag ucccgcuccg gguacca 87
<210> 298
<211> 85
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Leu5
<400> 298
gccgaagugg cgaaaucggu agacgcaguu gauucaaaau caaccguaga aauacgugcc 60
gguucgaguc cggccuucgg cacca 85
<210> 299
<211> 76
[0050] <212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Lys
<400> 299
gggucguuag cucaguuggu agagcaguug acuuuuaauc aauuggucgc agguucgaau 60
ccugcacgac ccacca 76
<210> 300
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Met
<400> 300
ggcuacguag cucaguuggu uagagcacau cacucauaau gaugggguca cagguucgaa 60
ucccgucgua gccacca 77
<210> 301
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Phe
<400> 301
gcccggauag cucagucggu agagcagggg auugaaaauc cccguguccu ugguucgauu 60
ccgaguccgg gcacca 76
<210> 302
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>

<223> tRNA Pro1
<400> 302
cggugauugg cgcagccugg uagcgcacuu cguucgggac gaaggggucg gagguucgaa 60
uccucuauca ccgacca 77
<210> 303
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Pro2
<400> 303
cggcacguag cgcagccugg uagcgcaccg ucauggggug ucgggggucg gagguucaaa 60
uccucucgug ccgacca 77
<210> 304
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Pro3
<400> 304
cggcgaguag cgcagcuugg uagcgcaacu gguuugggac cagugggucg gagguucgaa 60
uccucucucg ccgacca 77
<210> 305
<211> 95
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Sec
<400> 305
[0051] ggaagaucgu cgucuccggu gaggcggcug gacuucaaau ccaguuuggg ccgccagcgg 60
ucccgggcag guucgacucc ugugaucuuc cgcca 95
<210> 306
<211> 88
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Ser1
<400> 306
ggaagugugg ccgagcgguu gaaggcaccg gucuugaaaa ccggcgaccc gaaaggguuc 60
cagaguucga aucucugcgc uuccgcca 88
<210> 307
<211> 90
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Ser2
<400> 307
ggagagaugc cggagcggcu gaacggaccg gucucgaaaa ccggaguagg ggcaacucua 60
ccgggggguuc aaaucccccu cucuccgcca 90
<210> 308
<211> 93
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Ser3
<400> 308
ggugaggugg ccgagaggcu gaaggcgcuc cccugcuaag ggaguaugcg gucaaaagcu 60
gcauccgggg uucgaauccc cgccucaccg cca 93
<210> 309

<210> 88
<211> RNA
<212> 人工序列 (Artificial sequence)
<213>
<220>
<223> tRNA Ser5
<400> 309
ggugaggugu ccgaguggcu gaaggagcac gccuggaaag uguguauacg gcaacguauc 60
gggggguucga aucccccccu caccgcca 88
<210> 310
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Thr1
<400> 310
gcugauaugg cucaguuggu agagcgcacc cuugguaagg gugaggcccc caguucgacu 60
cuggguauca gcacca 76
<210> 311
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Thr2
<400> 311
gccgauauag cucaguuggu agagcagcgc auucguaaug cgaaggucgu agguucgacu 60
ccuauuaucg gcacca 76
<210> 312
<211> 76
<212> RNA
[0052] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Thr3
<400> 312
gcugauauag cucaguuggu agagcgcacc cuugguaagg gugaggucgg caguucgaau 60
cugccuauca gcacca 76
<210> 313
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Thr4
<400> 313
gccgacuuag cucaguaggu agagcaacug acuuguaauc aguaggucac caguucgauu 60
ccgguagucg gcacca 76
<210> 314
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Trp
<400> 314
aggggcguag uucaauuggu agagcaccgg ucuccaaaac cggguguugg gaguucgagu 60
cucuccgccc cugcca 76
<210> 315
<211> 85
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Tyr1

<400> 315
ggugggguuc ccgagcggcc aaagggagca gacuguaaau cugccgucau cgacuucgaa 60
gguucgaauc cuucccccac cacca 85
<210> 316
<211> 85
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Tyr2
<400> 316
ggugggguuc ccgagcggcc aaagggagca gacuguaaau cugccgucac agacuucgaa 60
gguucgaauc cuucccccac cacca 85
<210> 317
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Val1
<400> 317
gggugauuag cucagcuggg agagcaccuc ccuuacaagg agggggucgg cgguucgauc 60
ccgucaucac ccacca 76
<210> 318
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Val2A
<400> 318
gcguccguag cucaguuggu uagagcacca ccuugacaug gugggggucg gugguucgag 60
[0053] uccacucgga cgcacca 77
<210> 319
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Val2B
<400> 319
gcguucauag cucaguuggu uagagcacca ccuugacaug gugggggucg uugguucgag 60
uccaauugaa cgcacca 77
<210> 320
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNAPro1E2 体 (-CA) (32-38 = n)
<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(39)
<223> n是a, c, g或u
<400> 320
gggugauugg cgcagccugg uagcgcacuu cgnnnnnnnc gaaaggguca gggguucgaa 60
uccccuauca cccgc 75
<210> 321
<211> 75
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNAPro1E1 体 (-CA) (32-38 = n)
<220>

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(39)
<223> n是a, c, g或u
<400> 321
cggugauugg cgcagccugg uagcgcacuu cgnnnnnnnc gaaaggguca gggguucgaa 60
uccccuauca ccgac 75
<210> 322
<211> 76
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Glu2 体
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 322
gucccccuucg ucuagaggcc caggacaccg cccunnnacg gcgguaacag ggguucgaau 60
ccccuagggg acgcca 76
<210> 323
<211> 76
<212> RNA
[0054] <213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA AsnE2 体
<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(36)
<223> n是a, c, g或u
<400> 323
ggcucuguag uucagucggu agaacggcgg acunnnaauc cguaugucac ugguucgagu 60
ccagucagag ccgcca 76
<210> 324
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> tRNA Asp1 体
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(37)
<223> n是a, c, g或u
<400> 324
ggagcgguag uucagucggu uagaauaccu gccunnnacg caggggucg cggguucgag 60
ucccguccgu uccgcca 77

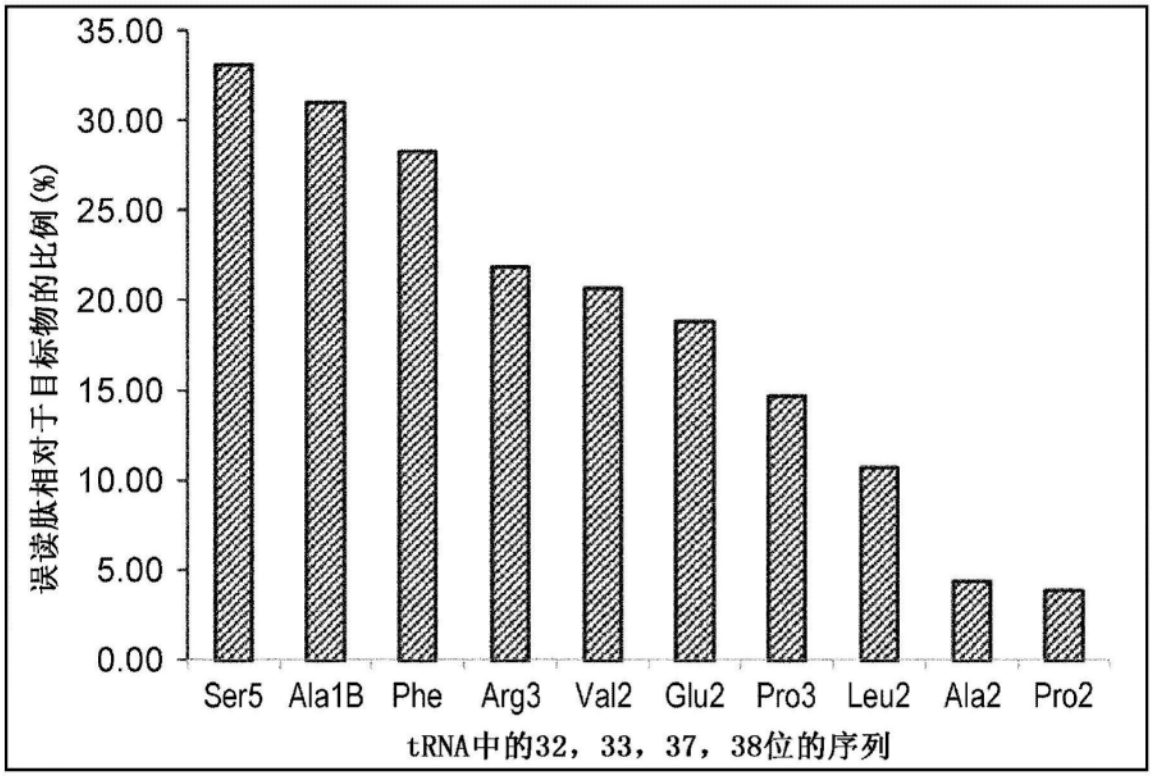

35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ser5
Ala1B
Phe
Arg3
Val2
Glu2
Pro3
Leu2
Ala2
Pro2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图1

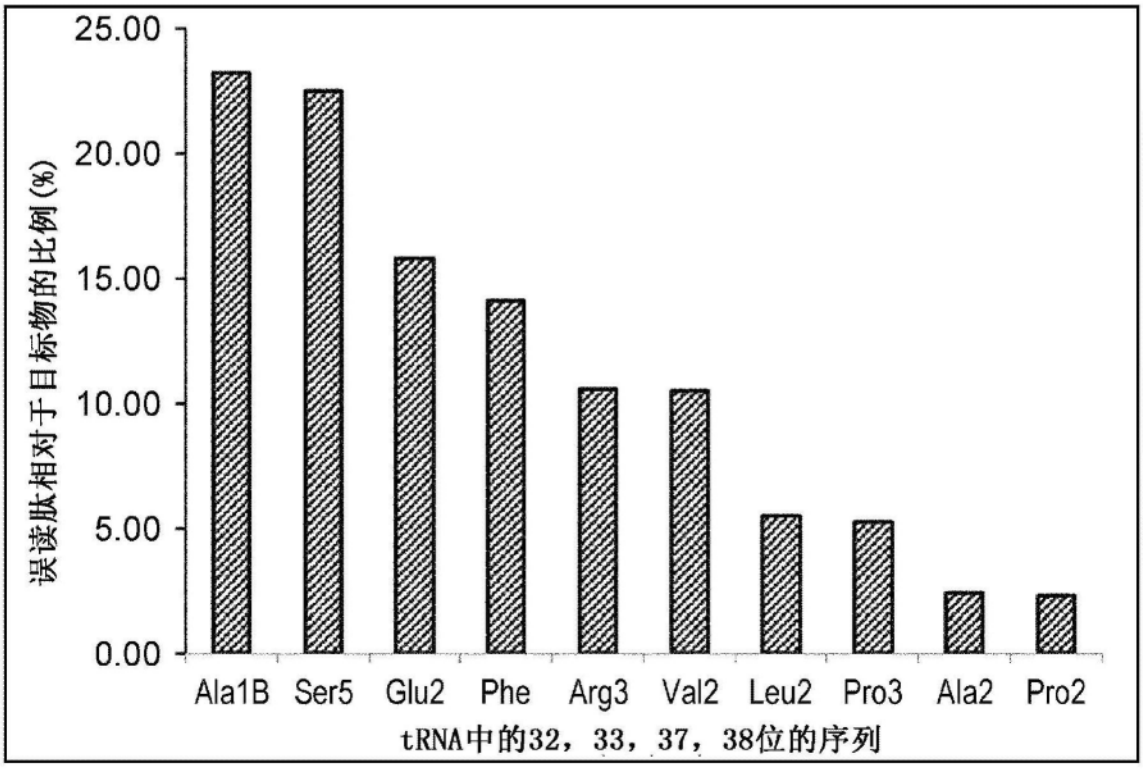

25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ala1B
Ser5
Glu2
Phe
Arg3
Val2
Leu2
Pro3
Ala2
Pro2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图2

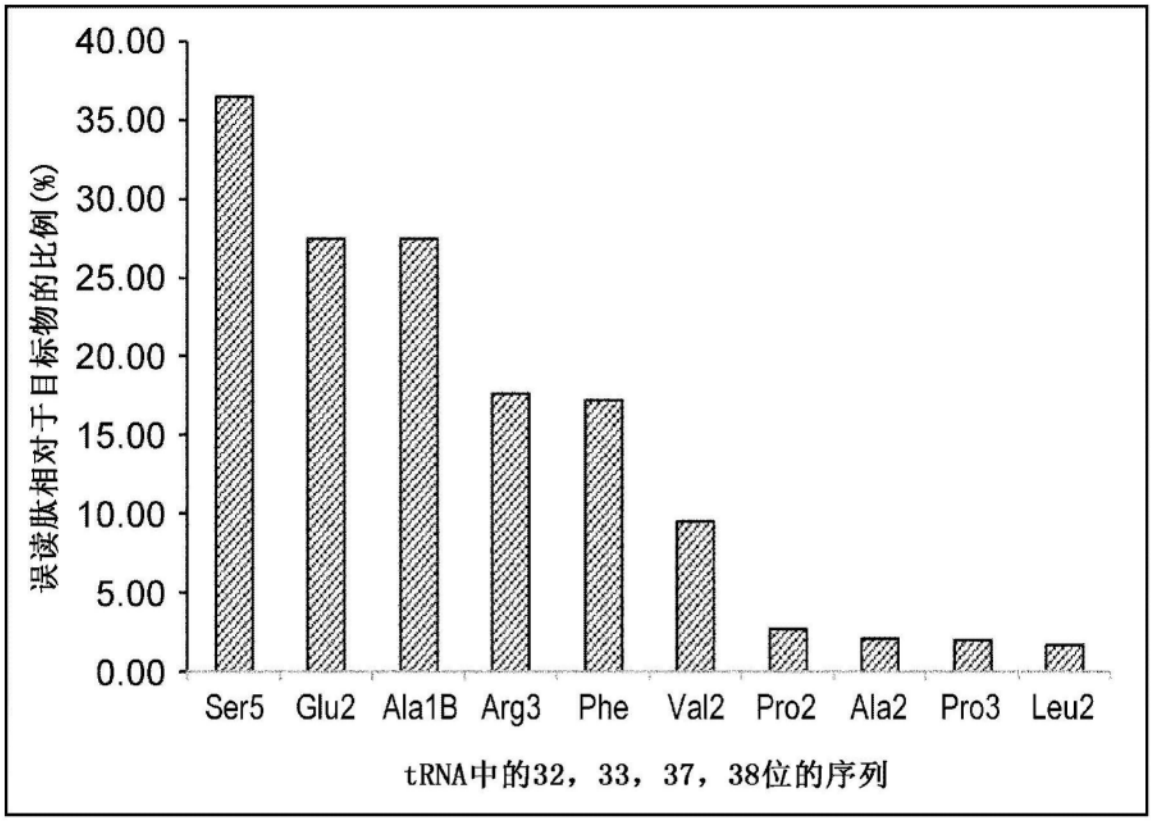

40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ser5
Glu2
Ala1B
Arg3
Phe
Val2
Pro2
Ala2
Pro3
Leu2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图3

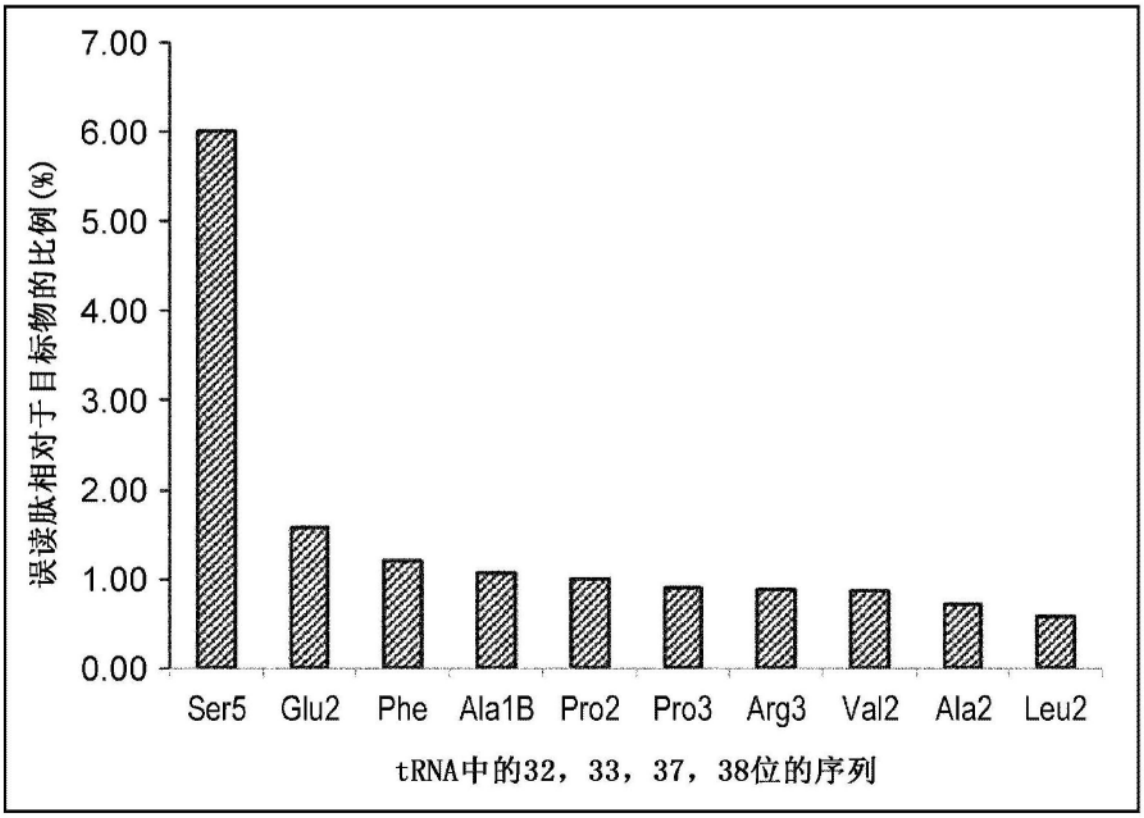

7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ser5
Glu2
Phe
Ala1B
Pro2
Pro3
Arg3
Val2
Ala2
Leu2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图4

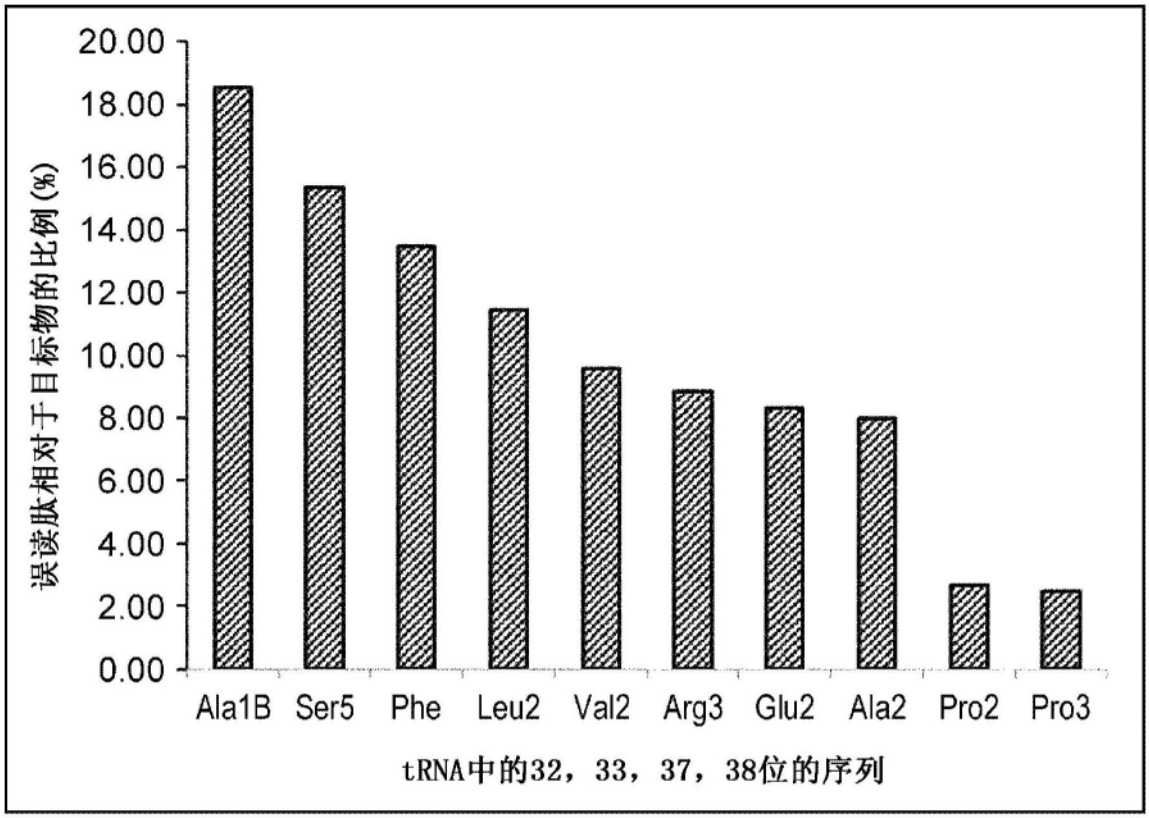

20.00
18.00
16.00
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ala1B
Ser5
Phe
Leu2
Val2
Arg3
Glu2
Ala2
Pro2
Pro3
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图5

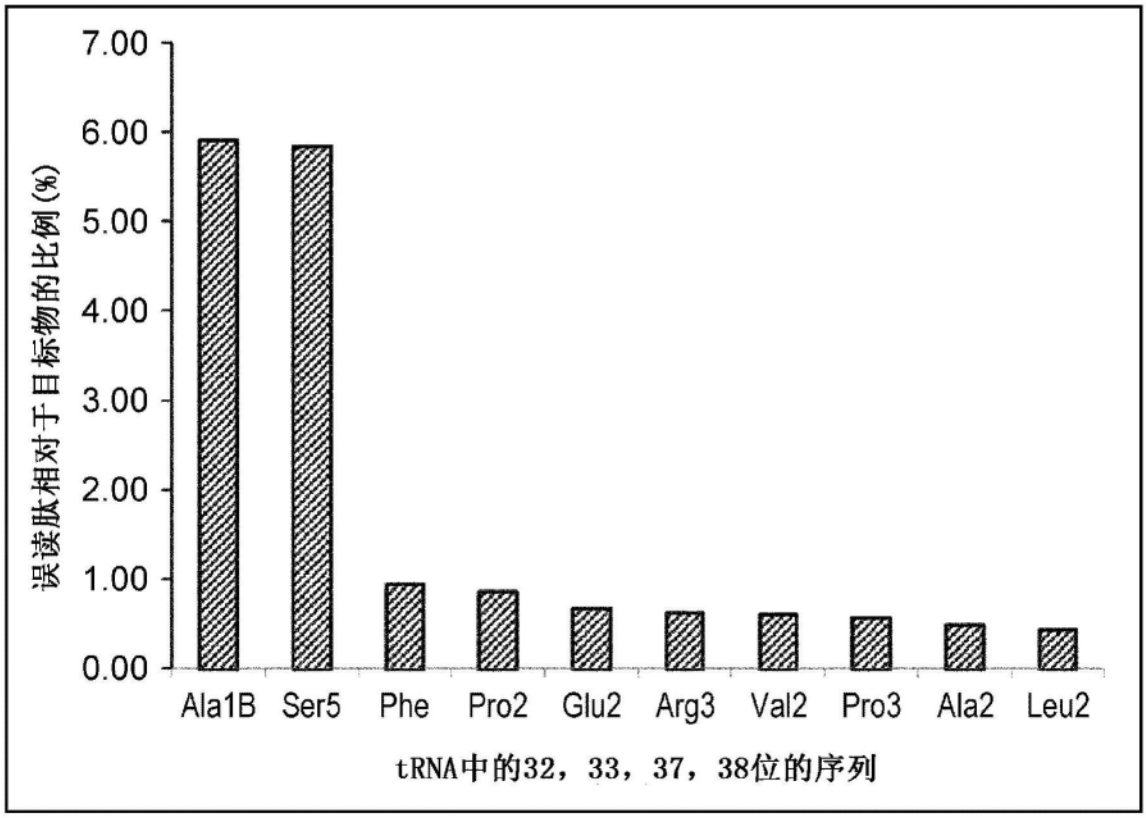

7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ala1B
Ser5
Phe
Pro2
Glu2
Arg3
Val2
Pro3
Ala2
Leu2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图6

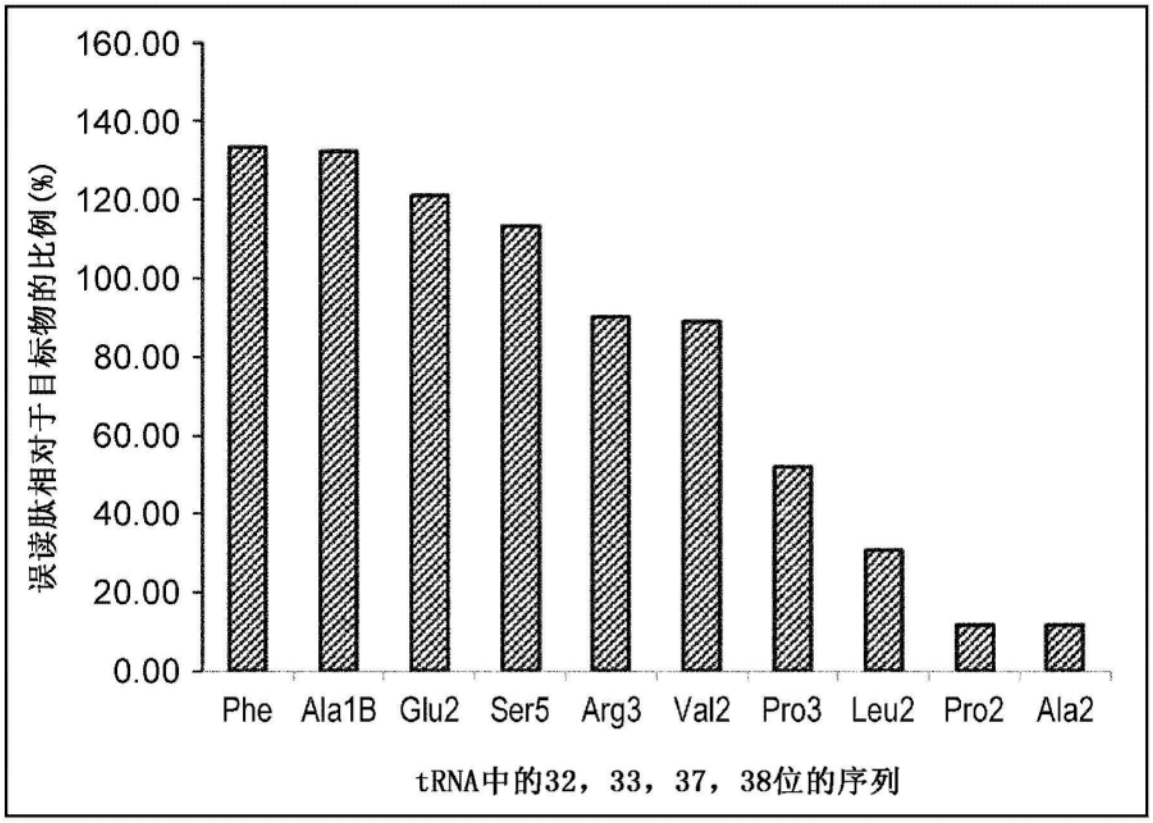

160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Phe
Ala1B
Glu2
Ser5
Arg3
Val2
Pro3
Leu2
Pro2
Ala2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图7

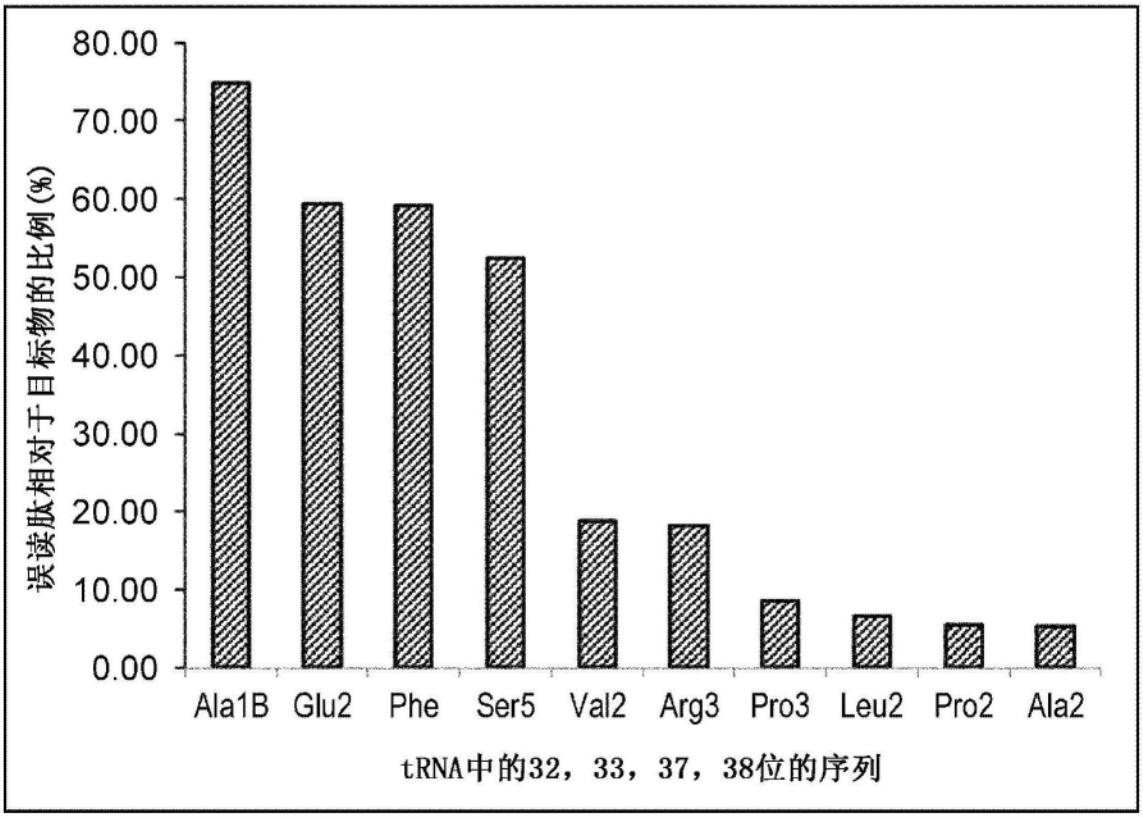

80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ala1B
Glu2
Phe
Ser5
Val2
Arg3
Pro3
Leu2
Pro2
Ala2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图8

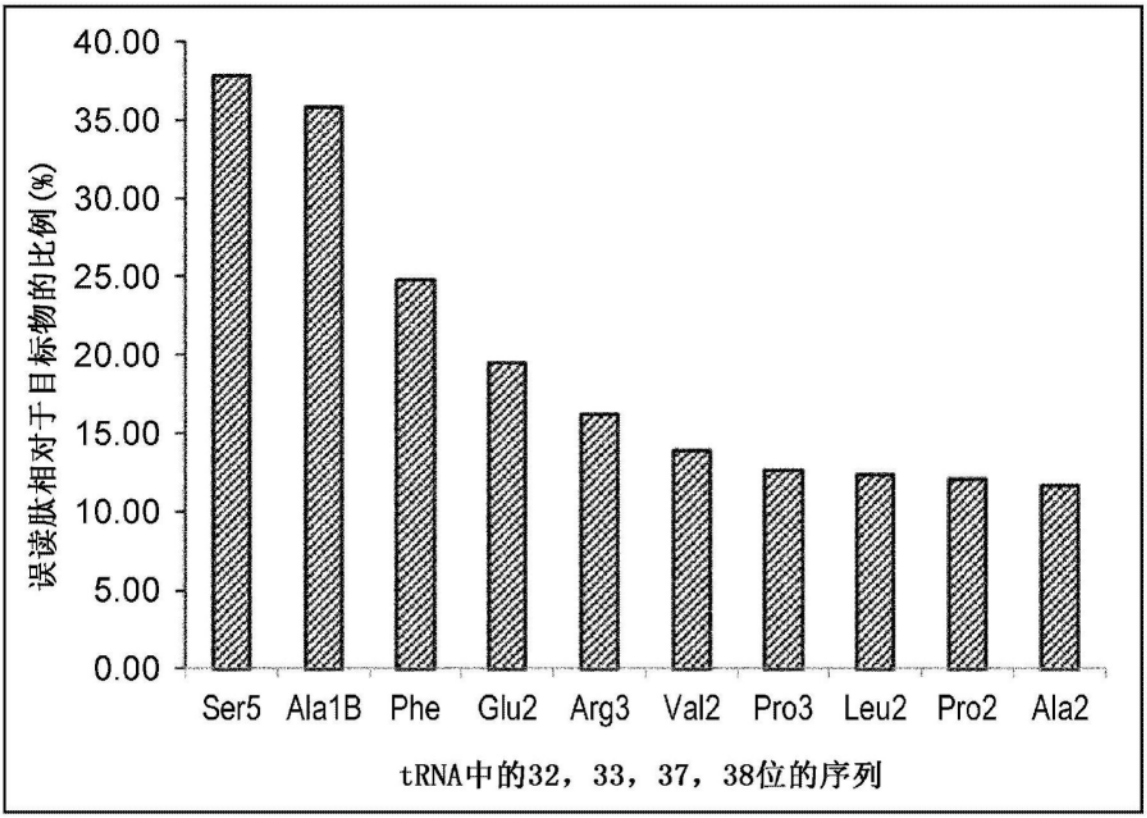

40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ser5
Ala1B
Phe
Glu2
Arg3
Val2
Pro3
Leu2
Pro2
Ala2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图9

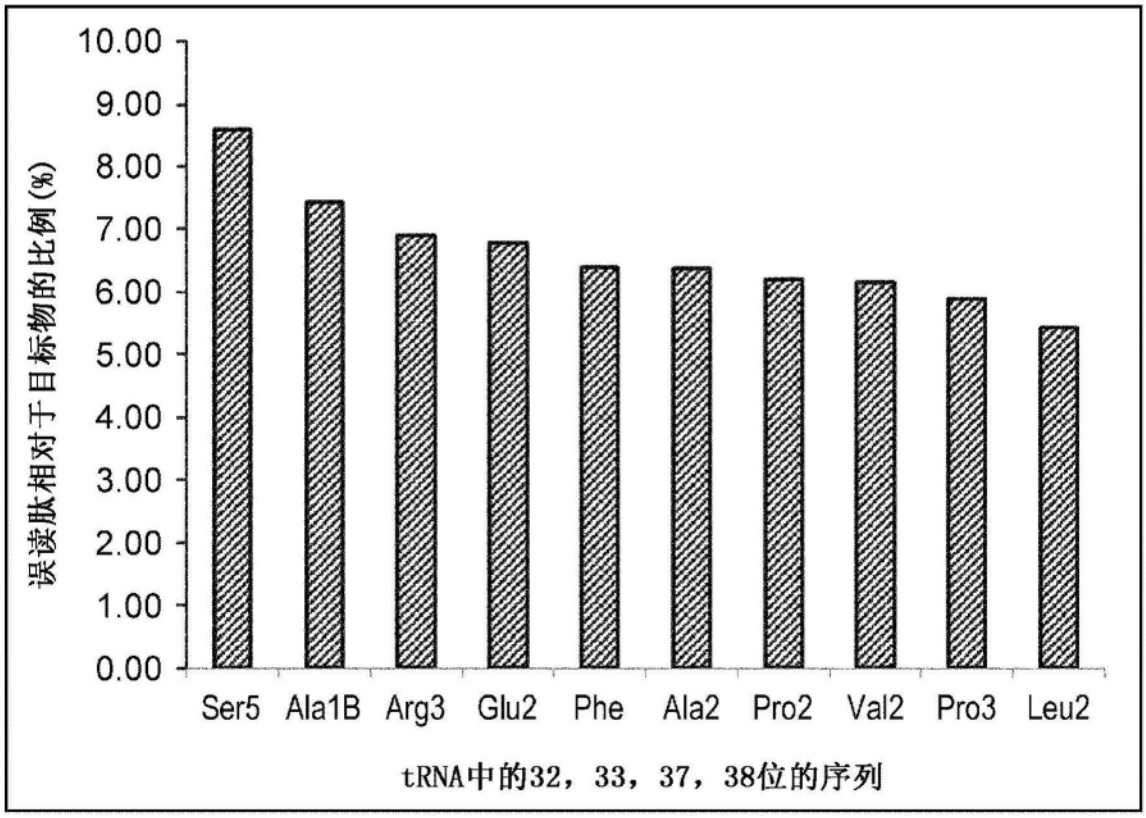

误读肽相对于目标物的比例(%)
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
Ser5
Ala1B
Arg3
Glu2
Phe
Ala2
Pro2
Val2
Pro3
Leu2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图10

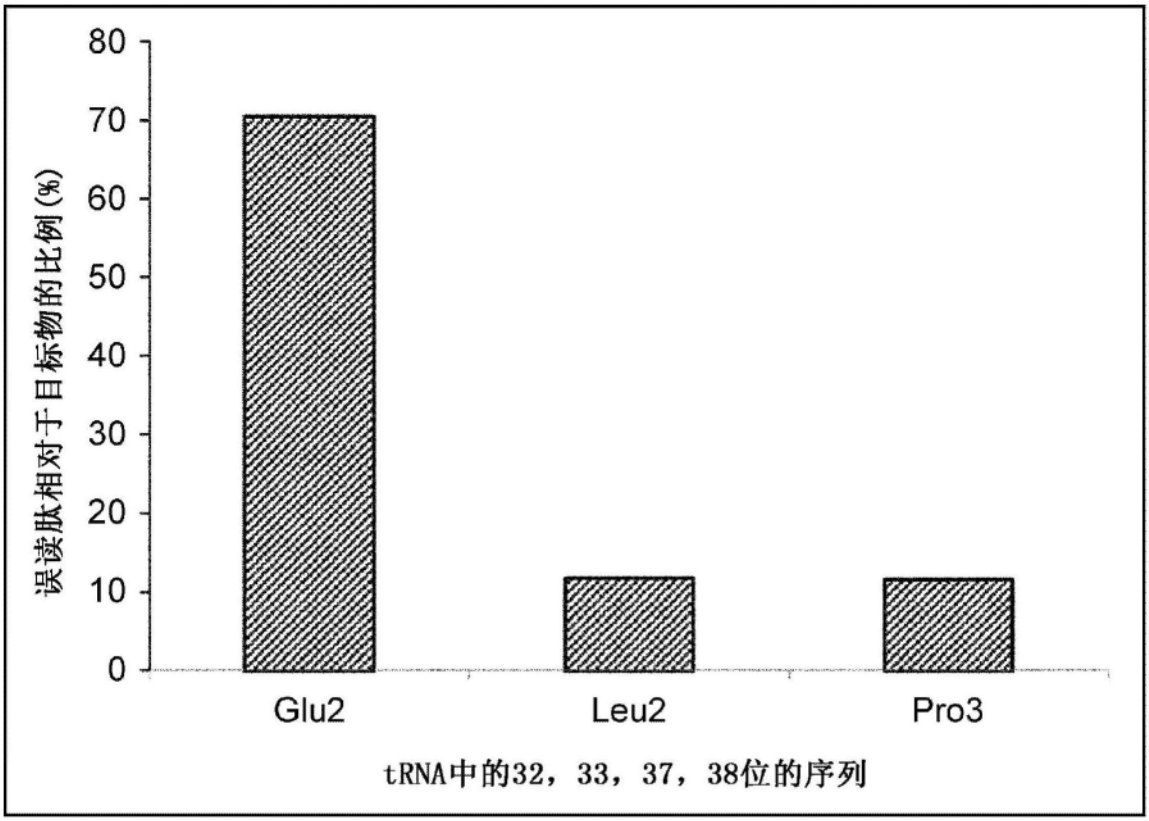

80
70
60
50
40
30
20
10
0
误读肽相对于目标物的比例(%)
Glu2
Leu2
Pro3
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图11

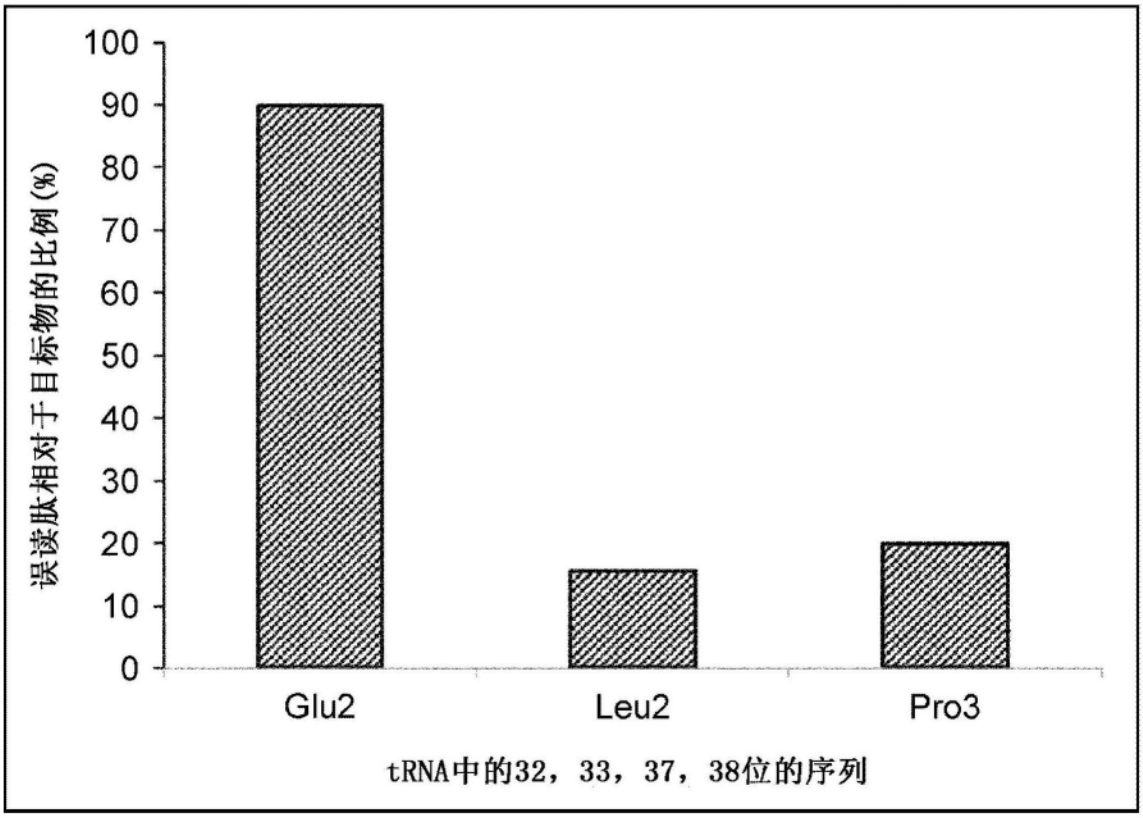

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
误读肽相对于目标物的比例(%)
Glu2
Leu2
Pro3
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图12

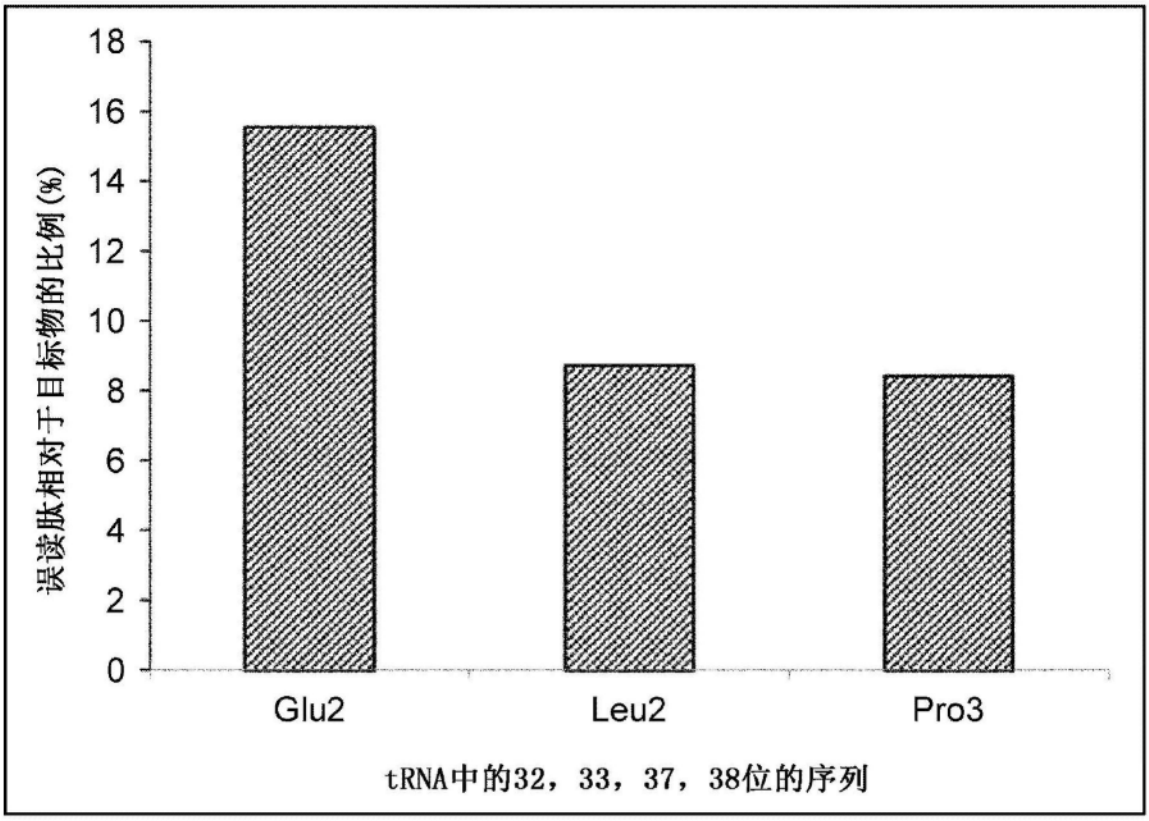

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
误读肽相对于目标物的比例(%)
Glu2
Leu2
Pro3
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图13

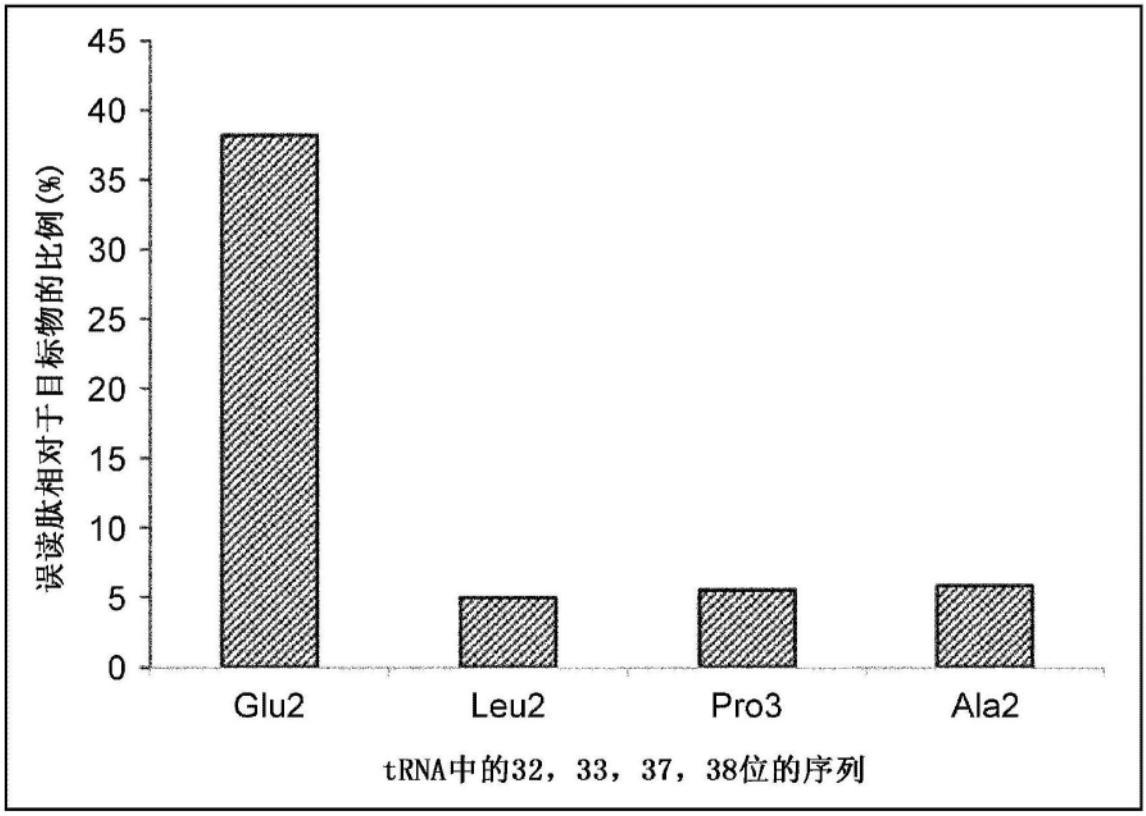

45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
误读肽相对于目标物的比例(%)
Glu2
Leu2
Pro3
Ala2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图14

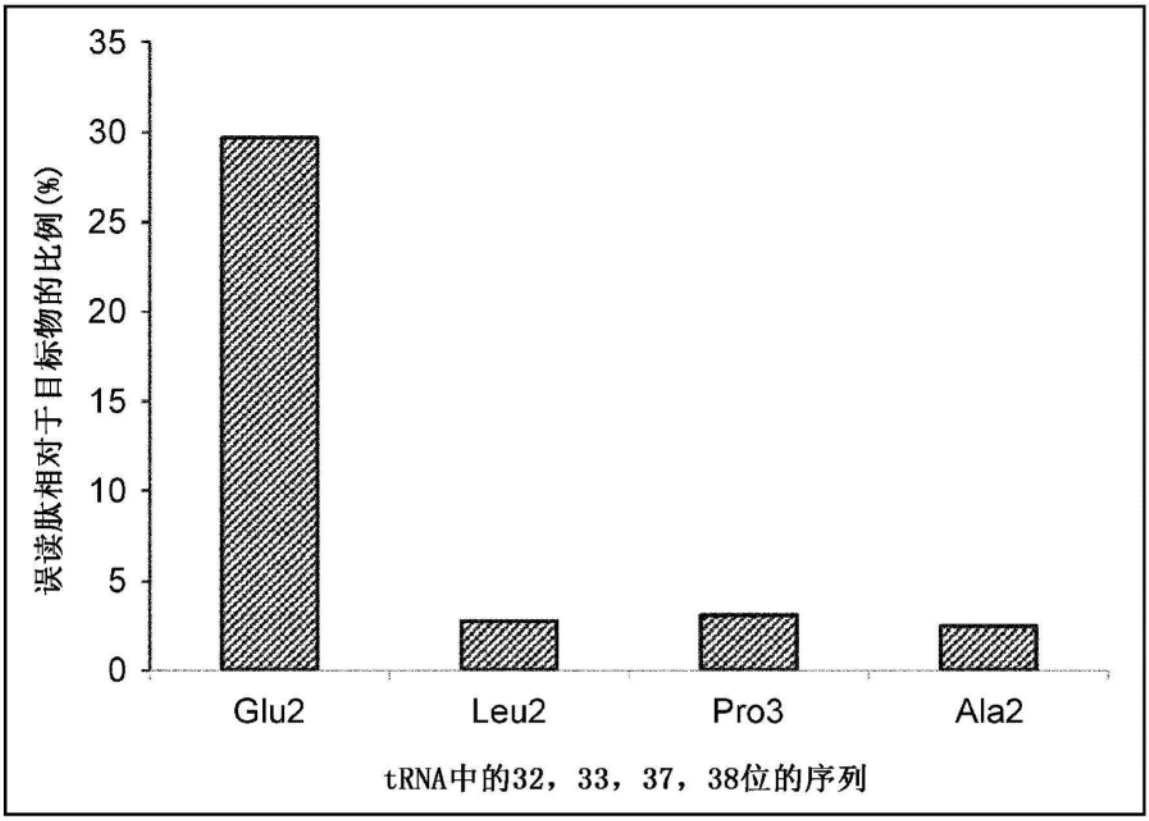

35
30
25
20
15
10
5
0
误读肽相对于目标物的比例(%)
Glu2
Leu2
Pro3
Ala2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图15

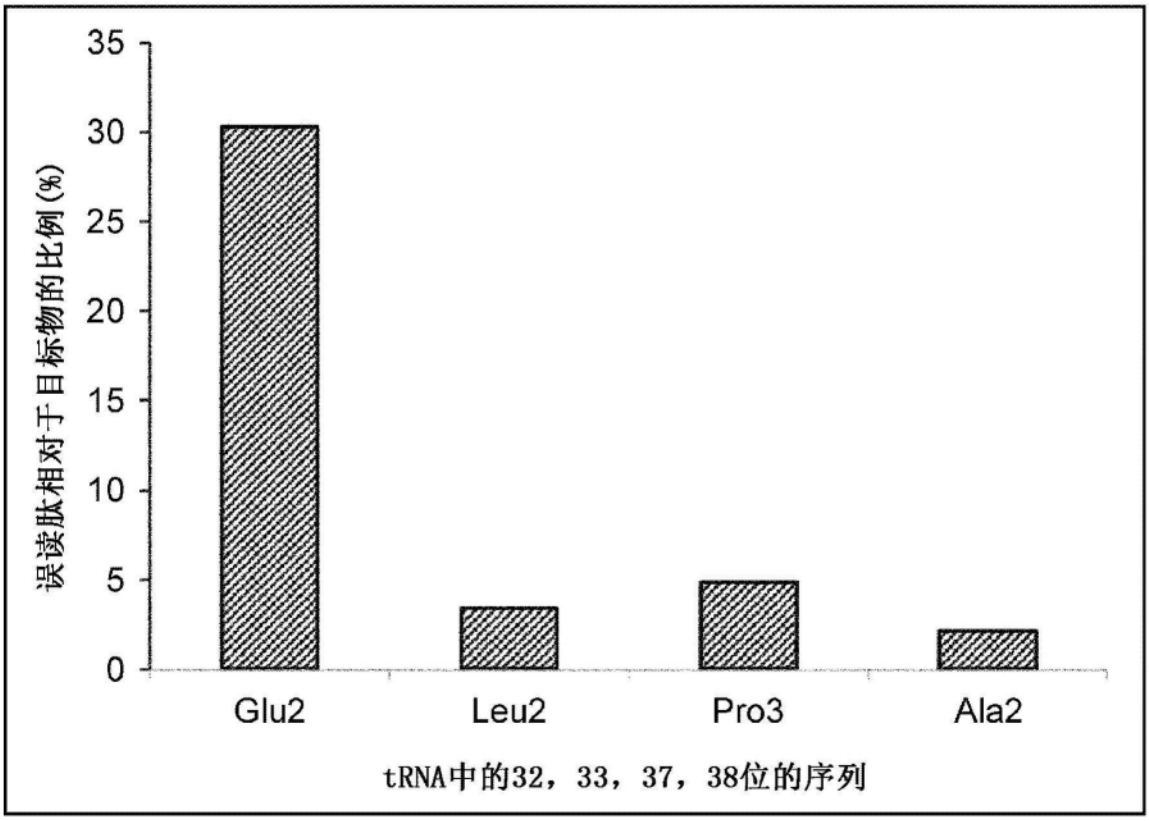

35
30
25
20
15
10
5
0
误读肽相对于目标物的比例(%)
Glu2
Leu2
Pro3
Ala2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图16

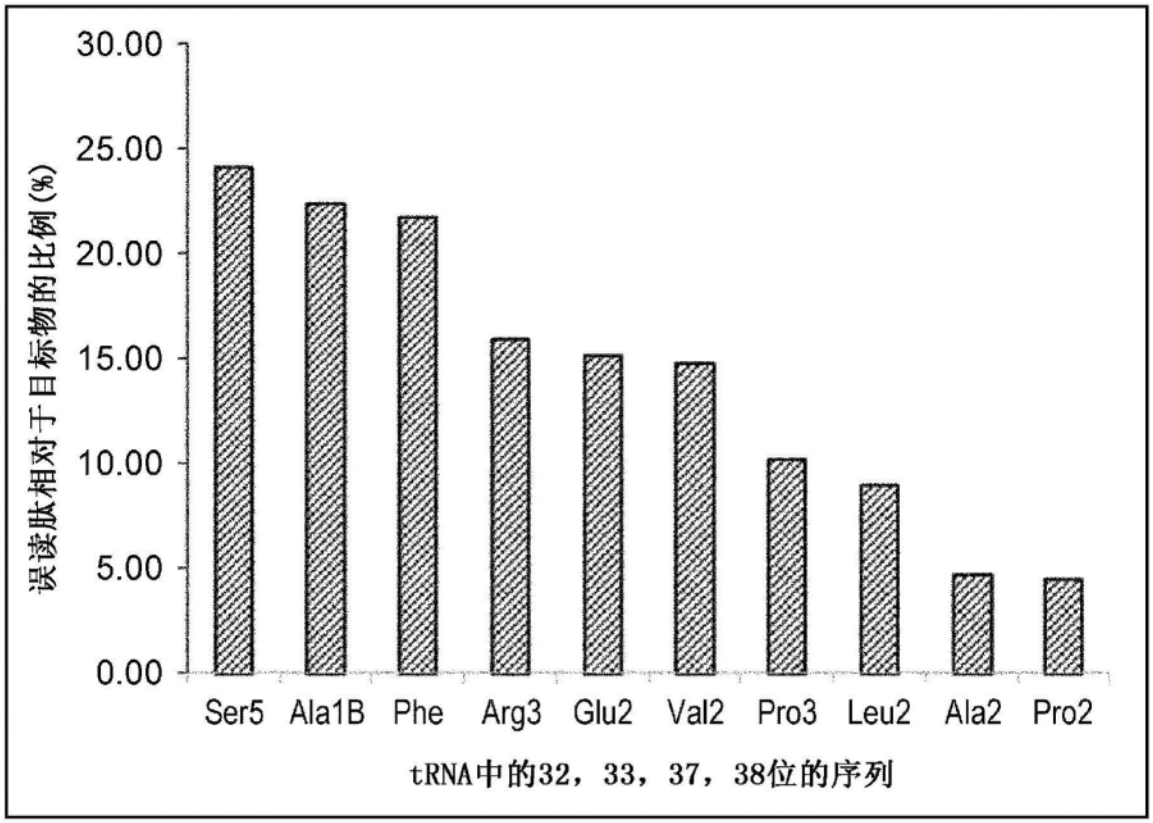

30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ser5
Ala1B
Phe
Arg3
Glu2
Val2
Pro3
Leu2
Ala2
Pro2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图17

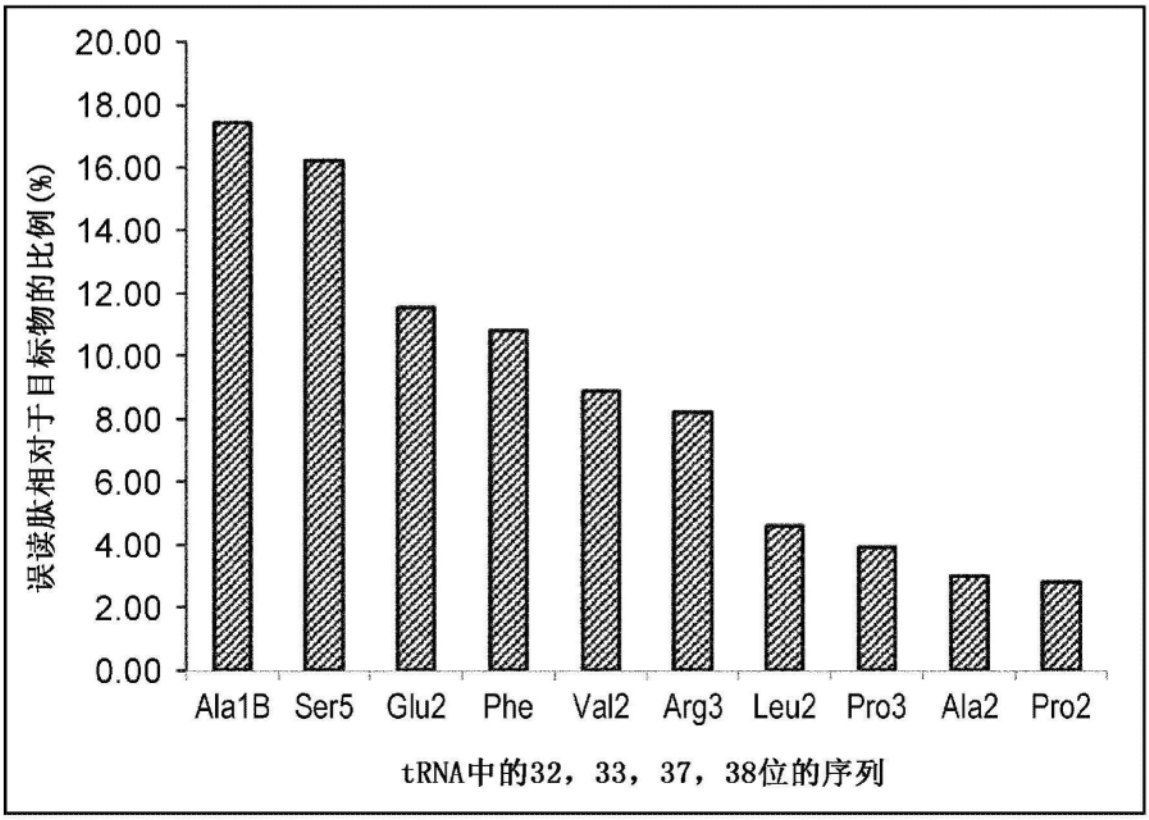

20.00
18.00
16.00
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
误读肽相对于目标物的比例(%)
Ala1B
Ser5
Glu2
Phe
Val2
Arg3
Leu2
Pro3
Ala2
Pro2
tRNA中的32，33，37，38位的序列

图18