



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110964088 A

(43)申请公布日 2020.04.07

(21)申请号 201811156095.0

(22)申请日 2018.09.30

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 王江云 刘晓红 康福英 胡诚
汪莉 许震

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 陈晓娜

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006.01)

C12N 9/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页
序列表10页 附图13页

(54)发明名称

一种可基因编码的人工光合作用蛋白质及其应用

(57)摘要

本发明提供一种可基因编码的人工光合作用蛋白质及其应用。具体地,本发明人通过遗传密码子扩展在超折叠黄色荧光蛋白sfYFP第66位掺入二苯甲酮-丙氨酸BpA,并经过进一步的遗传密码扩展得到一系列可基因编码的人工光敏蛋白PSP,如SEQ ID N0s:2、4、6、8、10所示。通过对包含单个半胱氨酸的PSP突变体进行特异性三联吡啶镍(II)配合物修饰,得到具有光催化活性的缀合物。所述PSP突变体被光敏后具有提高的衰减寿命,该过程能够模拟天然光合作用系统吸收光能,并进而催化二氧化碳还原。

1. 一种可基因编码的人工光合作用蛋白质,其通过遗传密码子扩展,在超折叠黄色荧光蛋白sfYFP第66位氨基酸位点掺入二苯甲酮-丙氨酸BpA而得到,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

2. 权利要求1所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Tyr203Phe突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

3. 权利要求1所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Tyr203Asp和His148Glu突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

4. 权利要求3所述的人工光合作用蛋白质,其中所述蛋白质的三重激发态的衰减寿命为123 μ s。

5. 权利要求3所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Glu95Cys突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

6. 权利要求3所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Glu95Cys、Val193Tyr和Thr97Tyr突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

7. 一种光敏二氧化碳还原酶,其为权利要求5或6的人工光合作用蛋白质与三联吡啶镍配合物的特异性缀合物,其中所述缀合物通过将N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在第95位半胱氨酸上,进一步在二价镍离子的存在下使二价镍离子与缀合在半胱氨酸上的N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺配位而获得。

8. 权利要求7所述的光敏二氧化碳还原酶,其中权利要求6的人工光合作用蛋白质与三联吡啶镍配合物的特异性缀合物具有2.6%的量子产率。

一种可基因编码的人工光合作用蛋白质及其应用

技术领域

[0001] 本发明提供一种可基因编码的人工光合作用蛋白质及其应用。具体地,本发明提供的可基因编码的人工光合蛋白质能够模拟天然光合作用系统吸收光能,催化二氧化碳还原成一氧化碳。

背景技术

[0002] 近年来,开发高效的二氧化碳固定方法以应对逐年升高的大气二氧化碳浓度,已经成为化学研究领域的重点问题。其中,植物的光合作用系统作为一种天然的解决方案,因其清洁,自组装,高效的光致电荷分离效率等优势受到广泛关注。然而,相比化学小分子催化剂,天然光合作用系统的二氧化碳还原效率相对低下。并且,天然光合作用系统由复杂的膜蛋白亚基和多种辅酶组成,这给研究和实际应用带来了不便。

[0003] 光合作用是地球上最重要的过程,其将太阳能转化成化学能,并将二氧化碳(CO₂)转化为生物量¹⁻⁴。目前,研究者对于如何提高光合作用效率并重复利用光系统推动挑战性的化学转化具有极大的兴趣,然而,这存在显著的技术挑战⁵⁻¹²。首先,由于天然光合系统由大量的膜蛋白、酶和辅因子组成,因此想从基因上改造光合作用机制是非常难的;其次,尽管光系统I和光系统II能够共同作用将NADP⁺还原为NADPH($E^0 = -320 \text{ mV}$,相对于标准的氢电极(standard hydrogen electrode, SHE),所有还原电势都相对于SHE),然而,NADPH由于还原力较低,从而不能促进二氧化碳(CO₂)到一氧化碳(CO)的直接还原($E^0 = -520 \text{ mV}$)。

发明内容

[0004] 发明简述

[0005] 为解决这些问题,本申请人一直致力于应用合成生物学方法,开发可基因编码的人工光合作用系统,使其兼具天然光系统和化学小分子催化剂的优势。这种人工设计的光合蛋白质不仅可以为研究二氧化碳还原方法提供新思路,也为进化具有非天然光催化活性的人工生命体提供基础。

[0006] 光敏剂能够利用光能使弱还原剂变为强还原剂,因而其是天然和人工光合作用机制中的关键成分。在本申请中,发明人从改造光敏蛋白入手,克服了现有技术中的种种限制,合理设计了一种可基因编码的人工光敏蛋白(photosensitizers protein, PSP)和一种光敏CO₂还原酶,所述光敏CO₂还原酶通过将PSP特定位点(例如第95位)突变成半胱氨酸,然后在该位点特异性缀合三联吡啶镍(II)配合物(例如,N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺修饰后加入镍离子)而得到。

[0007] 本发明人通过遗传密码扩展,在超折叠黄色荧光蛋白(superfolder yellow fluorescent protein, sfYFP,氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)第66位掺入二苯甲酮-丙氨酸(BpA),并经过进一步的遗传密码扩展得到一系列可基因编码的人工光敏蛋白(PSP)。

[0008] 在PSP的基础上,本发明人进一步引入其他特异性氨基酸残基突变,从而在PSP上特异性缀合三联吡啶镍(II)配合物,得到具有光催化二氧化碳生成一氧化碳的活性的蛋白

缀合物,将其称为光催化性二氧化碳还原酶(PSP2 95C terpyridine Ni(II),简称为PSP2T)。PSP2T的分子量仅为 27kD,其可以通过在体外用三联吡啶镍(II)配合物化学修饰遗传表达的PSP蛋白而制备。PSP2T在水/DMF溶液中起作用,不需要贵金属,CO₂/CO转化量子效率(conversion quantum efficiency)为2.6%,远高于在相似条件下使用纳米晶体或小分子光敏剂的大多数光催化剂的CO₂/CO 转化量子效率³。除了PSP2T的简单性之外,本发明人在对PSP2T的研究中受到启发,并且了解了复杂的光合作用机制的实质:可见光吸收,强还原力的产生,和二氧化碳还原。

[0009] 在光吸收时,PSP被有效地转化为寿命较长的三重态激发态PSP* (long-lived triplet excited state PSP*),进一步的电子传递使弱还原力(如具有较弱还原力的NADH)提高,产生还原力大大增强的超还原剂PSP· ($E^0 < -1.14V$)。实验表明,在没有光激发情况下,EuDTPA (Europium(II) Diethylenetriaminepentaacetic acid,二乙烯三氨基乙酸铕(II))不能将PSP 还原为自由基状态,EuDTPA具有非常低的还原电势,其标准还原电势为 $E^0 = -1.14V$ 。

[0010] 接着,本发明人解析了PSP·的晶体结构,该晶体结构为使用PSP·促进新型酶反应提供了必需的原子结构信息。重要的是,本发明人通过研究证明了对PSP2T活性重要的三个变量可以通过诱变方便地且独立地进行优化,从而产生显著提高的二氧化碳还原活性。第一,可以微调发色团的光化学特性,使其光激发态具有充足的氧化性,能够氧化弱牺牲还原剂(sacrificial reductant,SR),从而产生可用于推动二氧化碳还原催化剂的还原的强还原基团;第二,可以微调发色团与催化中心之间的距离,从而促进从发色团到催化中心的连续电子转移步骤,并且同时防止不利的电荷重组步骤(detrimental charge recombination step);第三,由于二氧化碳还原需要电子和质子,可以微调催化中心的微环境,从而优化质子和电子的转移。

[0011] 然而,通过改造天然的光合作用系统、纳米晶体或小分子光敏剂难以实现对上述三个变量的容易且独立的优化。因此,本发明人的工作代表有希望的光氧还酶设计新途径,能够提供研究蛋白上的多种电子/质子转移的重要模型,并且在可再生能量、二氧化碳利用、温室气体排放减少和光氧还催化剂中具有广泛应用。

[0012] 发明详述

[0013] 本发明人在前期研究中发现,一种分子量仅为约27kD的荧光蛋白具有改造为类似天然光系统的光合蛋白质的潜能。首先,研究发现该荧光蛋白受光激发后,其发色团可以生成具有高还原活性的中间体,这种中间体可以高效率的向位于蛋白质β折叠桶外的电子受体传递电子。此外,应用基因密码子扩展技术,发明人可以特异性的插入非天然氨基酸,从而取代原组成发色团中的酪氨酸。这使得研究人员可以理性设计荧光蛋白的荧光发色团化学结构,优化其吸收光谱、激发态寿命、自由基还原电势等一系列光化学性质。

[0014] 设计基于荧光蛋白突变体的高效二氧化碳光还原蛋白质的核心问题在于如何延长其发色团受激发后所生成的还原性中间态的寿命,和降低它的还原电势。在本发明中,发明人选择了一种带有二苯甲酮取代基的酪氨酸类似物(BpA)来改造发色团。二苯甲酮是一种有机光催化中常用的光敏剂。当它受到一定波长的光照射时,其激发态会系间穿越为寿命较长的三重态。这种三重态进而和牺牲还原剂反应生成高活性的自由基态,催化下游氧化还原反应。使用密码子扩展方法插入BpA改造荧光蛋白的发色团后,其新生成的荧光蛋白

(PSP) 保留了这种特性。应用瞬态吸收光谱的研究表明,受光激发后,插入BpA的新发色团可以几乎全部转化为三重态;在有牺牲还原剂(例如抗坏血酸)的存在下,三重态中间体等价于快速氧化牺牲还原剂,从而生成自由基态。该自由基被蛋白质骨架保护,因此在没有氧气存在的条件下可以稳定存在10分钟以上。另一方面,针对发色团小分子类似物的电化学分析表明,所生成的单电子还原态具有接近-1.5V的还原电势。这不仅满足了还原二氧化碳的需求,也低于已知的天然生物还原剂。

[0015] 在获得了可以光激发生成强还原活性的荧光蛋白后,本发明人进一步应用化学或生物学方法在PSP外表面特定位点引入了三联吡啶镍配合物(这是一种已知的小分子二氧化碳还原电化学催化剂)。这种修饰的蛋白质具有在光照条件下还原二氧化碳生成一氧化碳的活性,其24小时一氧化碳转化数最高为120,光量子产率为2.6%,这高于大部分已报道的二氧化碳光还原催化剂。这说明了基于蛋白质自组装特性所带来的电子传递优化和活性的提高。

[0016] 在第一方面,本发明提供一种可基因编码的人工光合作用蛋白质(PSP),其通过遗传密码子扩展,在超折叠黄色荧光蛋白(superfolder yellow fluorescent protein, sfYFP,氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)第66位氨基酸位点掺入二苯甲酮-丙氨酸(BpA)而得到。换言之,sfYFP第66位酪氨酸(Tyr,Y)被二苯甲酮-丙氨酸(BpA)取代,这种氨基酸取代通过遗传密码子扩展方法引入。sfYFP(SEQ ID NO:1)是一种人工合成的蛋白,其氨基酸序列与Mesorhizobium loti序列有88%的相似性。

[0017] 在一个实施方案中,通过遗传密码子扩展,在超折叠黄色荧光蛋白(superfolder yellow fluorescent protein,sfYFP,氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)第66位氨基酸位点掺入二苯甲酮-丙氨酸(BpA)而得到的人工光合作用蛋白质如SEQ ID NO:2所示,命名为sfYFP-BpA66。

[0018] 在sfYFP-BpA66的基础上,进一步通过遗传密码子突变,将sfYFP中第203位酪氨酸(Tyr)突变为苯丙氨酸(Phe),该双重突变体sfYFP-BpA66-Phe203命名为PSP1,其氨基酸序列为SEQ ID NO:4所示。更进一步地,将sfYFP中第203位酪氨酸(Tyr)突变为天冬氨酸(Asp),且将第148位组氨酸(His)突变为谷氨酸(Glu)的三重突变体sfYFP-BpA66-Asp203Glu148称为PSP2,其氨基酸序列为SEQ ID NO:6所示。

[0019] 其中PSP2在光化学反应中,能够可逆地形成PSP2自由基(PSP2·)。PSP2·的可逆性形成表示,尽管PSP2·可以与氧反应(这是几乎所有超还原自由基的共同特性),但是反应又在不破坏发色团的前提下产生PSP2。由于已知多种二氧化碳还原剂被氧不可逆地破坏,因此,这种特性对于催化剂的稳健性是重要的。并且,PSP2三重激发态(PSP2*,图4a/b)的衰减寿命为123 μ s。PSP2·的还原电势小于-1.14V。PSP2·的pKa为10.6。

[0020] 在PSP2的基础上,将第95位氨基酸由谷氨酸(Glu)突变为半胱氨酸(Cys,单字母符号:C),得到PSP2-95Cys突变体(也表示为PSP2-95C),其氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。该突变体在用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(实施例1合成的化合物7)修饰后,在二价镍离子的存在下得到的最终缀合物命名为PSP2T1,PSP2T1具有较高的二氧化碳还原活性,其中N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在PSP2-95C突变体的第95位半胱氨酸残基上。

[0021] 为了研究局部质子供体的存在是否能够提高催化效率,发明人在PSP2T1的基础

上,将第93位的缬氨酸 (Val) 和97位的苏氨酸 (Thr) 均突变为酪氨酸 (Tyr, 单字母符号:Y), 得到突变体PSP2-95C93Y97Y, 其氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。该突变体在用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (实施例1合成的化合物7) 修饰后 (N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在第95位半胱氨酸上), 在二价镍离子的存在下得到的最终缀合物命名为PSP2T2, 其表现出显著提高的一氧化碳转化数 (TON) (图3c/d)。本发明人计算得知PSP2T2具有2.6%的量子产率, 用于二氧化碳向一氧化碳的光催化性还原 (表2-3)。

[0022] 事实上, 在PSP2T1和PSP2T2中, 在第95位半胱氨酸上缀合三联吡啶镍 (II) 配合物。其中三联吡啶镍 (II) 配合物是一种已知的小分子二氧化碳还原电化学催化剂。

[0023] 在整个说明书中, BpA66表示超折叠黄色荧光蛋白 (sfYFP) 第66位酪氨酸突变为BpA, 也可以表示为Tyr66BpA (即, 数字表示突变的氨基酸位点, 数字左侧是突变之前的氨基酸残基, 数字右侧是突变之后的氨基酸残基)。Phe203表示超折叠黄色荧光蛋白 (sfYFP) 第203位酪氨酸 (Tyr) 突变为苯丙氨酸 (Phe), 也可以表示为Tyr203Phe。95Cys表示超折叠黄色荧光蛋白 (sfYFP) 第95位由谷氨酸 (Glu) 突变为半胱氨酸 (Cys, 单字母符号:C), 也可以表示为Glu95Cys或95C。其他位点的氨基酸突变也采用上述表示方法。

[0024] 在第二方面, 本发明提供一种光敏二氧化碳还原酶 (PSP2 terpyridine Ni (II), 也可称为PSP2-三联吡啶镍配位缀合物, 简称为PSP2T), 其通过将第一方面的可基因编码的人工光合作用蛋白质 (PSP) 特定位点 (例如第95位) 突变成半胱氨酸, 然后在该位点特异性缀合N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺, 并在二价镍离子的存在下使二价镍离子与缀合在半胱氨酸上的N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺配位而得到。

[0025] 在一个实施方案中, 人工光合作用蛋白质 (PSP) 与三联吡啶的缀合通过使相应的人工光合作用蛋白质与N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (实施例1合成的化合物7) 反应而实现。具体地, N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在PSP中引入的单个半胱氨酸残基上。在一个优选的实施方案中, 在PSP蛋白中第95位引入半胱氨酸, N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺与所述半胱氨酸特异性缀合, 在二价镍离子的存在下得到的PSP-三联吡啶镍 (II) 配合物缀合物具有催化二氧化碳的光化学反应生成一氧化碳的活性。

[0026] 在一个优选的实施方案中, 突变体PSP2-95C在用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (实施例1合成的化合物7) 修饰后 (N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺缀合在第95位半胱氨酸上), 在二价镍离子的存在下得到的最终缀合物命名为PSP2T1, 具有较高的二氧化碳还原活性。

[0027] 突变体PSP2-95C93Y97Y用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (实施例1合成的化合物7) 修饰后, 在二价镍离子存在条件下得到PSP2T2, 表现出显著提高的一氧化碳转化数 (TON) (图3c/d)。本发明人计算得知PSP2T2具有2.6%的量子产率, 用于二氧化碳向一氧化碳的光催化性还原 (表2-3)。

[0028] 在一个实施方案中, 突变体PSP2-95C或PSP2-95C93Y97Y的三联吡啶修饰可以借助生物体实现。例如, 在适当的宿主细胞中转入PSP2-95C 或PSP2-95C93Y97Y的表达载体, 在培养基中加入适当的表达诱导剂和三联吡啶 (例如, N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺), 表达后, 再加入适当的二价镍离子, 由此可以得到相应的蛋白-三联吡啶镍 (II) 配合物缀合物。

[0029] 在第三方面, 本发明提供一种利用本发明第二方面所述的光敏二氧化碳还原酶光

催化性还原二氧化碳的方法,所述方法包括下述步骤:在反应体系中加入本发明第二方面所述的光敏二氧化碳还原酶(例如,PSP2T1 或PSP2T2,优选PSP2T2)和牺牲还原剂,进行可见光辐照,可以将反应体系中的二氧化碳还原为一氧化碳。其中可见光辐照可以利用模拟太阳光光谱的氙灯进行。本领域技术人员能够理解,“反应体系中的二氧化碳”包括在反应体系中包含能够产生二氧化碳的相关反应物的情形。

[0030] 综上所述,本发明提供下述实施方案:

[0031] 1.一种可基因编码的人工光合作用蛋白质,其通过遗传密码子扩展,在超折叠黄色荧光蛋白sfYFP第66位氨基酸位点掺入二苯甲酮-丙氨酸 BpA而得到,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0032] 2.第1项所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Tyr203Phe突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0033] 3.第1项所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Tyr203Asp和 His148Glu突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0034] 4.第3项所述的人工光合作用蛋白质,其中所述蛋白质的三重激发态的衰减寿命为123us。

[0035] 5.第3项所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Glu95Cys突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0036] 6.第3项所述的人工光合作用蛋白质,其还包含Glu95Cys、Val193Tyr 和Thr97Tyr突变,氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0037] 7.一种光敏二氧化碳还原酶,其为第5或6项的人工光合作用蛋白质与三联吡啶镍配合物的特异性缀合物,其中所述缀合物通过将 N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在第95位半胱氨酸上,进一步在二价镍离子的存在下使二价镍离子与缀合在半胱氨酸上的 N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺配位而获得。

[0038] 8.第7项所述的光敏二氧化碳还原酶,其中第6项的人工光合作用蛋白质与三联吡啶镍配合物的特异性缀合物具有2.6%的量子产率。

[0039] 本发明的优点在于,与半导体纳米晶体和小分子光敏剂相比,本发明构建的PSP提供特有的优点,例如,与宽泛的生物系统具有更高的相容性,不依赖贵金属,经由突变的可转换的光化学特性,和自组装成精确的三维结构的能力,这能够允许其功能的模块性扩展和准确的机制表征。由此,PSP能够潜在地致敏多种挑战性的化学转化,涉及的领域多样,诸如太阳能转化、光生物学、环境修复和工业生物学等。

[0040] 本发明合成的光合作用蛋白质可以通过遗传编码在生物体中合成,能够在不破坏发色团的前提下与氧反应可逆地形成自由基形式,是一种稳健的光化学反应催化剂。并且光辐照后产生的三重激发态的衰减寿命长,更有利于还原二氧化碳。

附图说明

[0041] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0042] 图1.PSP和PSP2T的合理设计。

[0043] (a) 蛋白氧化中心和小分子的还原电势。 Ni(II)(terpy) :镍-三联吡啶复合物。 CdS :硫化镉量子点。

[0044] (b) 上图:酪氨酸(左侧)和二苯甲酮-丙氨酸(BpA,右侧)的结构。下图:在连二亚硫酸盐(dithionite)的存在下,用405nm激光笔照射sfYFP、PSP1和PSP22分钟,然后用数码相机拍摄它们的照片。

[0045] (c) 使用连二亚硫酸盐作为牺牲还原剂(SR),在pH 7的100mM Tris-HCl缓冲液中,PSP1、PSP1•、PSP2和PSP2•的紫外可见吸收(UV-Vis)光谱。连二亚硫酸盐在高于350nm的波长下没有吸收。

[0046] (d) PSP2•在不同pH下的UV-Vis光谱。

[0047] (e) 使用NADH作为还原剂,在405nm激光照射之前和之后,PSP2(基本为水平线)和PSP2•(有波峰和波谷的曲线)的X-波段电子自旋共振(X-band ESR)光谱。使用NADH作为牺牲还原剂是因为其没有背景ESR信号。插入图:含有PSP2的ESR管在405nm激光照射之前和之后(变成红色)的照片。

[0048] (f) 在N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的发色团小分子类似物(E)-4-(4-苯甲酰苯亚甲基)-1,2-二甲基-1H-咪唑-5(4H)-酮(BpAChm,化合物6,参见实施例1)的循环伏安法(cyclic voltammetry,CV)测量。

[0049] 图2.PSP的晶体学表征。

[0050] (a) PSP2晶体X-射线衍射的装置设置。

[0051] (b) 在结晶缓冲液中存在160mM连二亚硫酸盐的条件下,用405nm激光笔照射的PSP2晶体的照片。照射后,溶液变红,停止照射后,溶液逐渐恢复原来的颜色。

[0052] (c) 在光化学还原之前,基态发色团结构快照,BpA66残基的两个苯环的二面角为 58° 。

[0053] (d) 在连续405nm激光照射下采集的PSP2•发色团结构的快照。PSP2•中两个苯环的二面角为 29.1° 。

[0054] (e) 箭头指示与黑暗状态(黄色)相比较,在405nm激光照射后PSP2•(红色)中BpA66残基的苯环的明显旋转。 $\text{O}(21)-\text{C}(7)-\text{C}(6)-\text{C}(5)$ (参见图7)的二面角从 -146.9° 变为 -24.1° ,这导致BpA羰基方向的完全翻转。

[0055] 图3.PSP2T的设计和表征。

[0056] (a) 提议的PSP2T催化机制的示意图。

[0057] (b) 由N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(化合物7,参见实施例1)改良的多种PSP2单半胱氨酸变体催化的CO形成的转化数(TON)。显示了催化剂到PSP2发色团的距离。

[0058] (c) PSP2T突变体催化的CO形成的TON。

[0059] (d) PSP2T1/2催化的CO形成随照射时间变化的TON。

[0060] 所有情形中的误差条为标准误差(s.d.)($n=3$)。

[0061] 图4.PSP2的瞬时吸收光谱(a,c)和光谱动力学曲线(spectra temporal evolution)(b,d)。

[0062] (a) PSP2的瞬时吸收光谱。

[0063] (b) 在370nm、430nm和570nm记录的PSP2的动力学轨迹。

[0064] (c) 在100mM抗坏血酸盐(Asc)的存在下,PSP2的瞬时吸收光谱。抗坏血酸盐(Asc)没有355nm吸收并且在空气中是稳定的,因而用作还原剂。

[0065] (d) 在0、50、100、150mM抗坏血酸盐(Asc)的存在下,在430nm记录的动力学轨迹。

[0066] (e) PSP的光化学过程总结。光子吸收后,电子从 S_0 基态跃迁到 S_1 更高能态的单线激发态。在这一系统中, S_1 态通过荧光几乎没有机会回到 S_0 基态,而是通过系间跨越(intersystem crossing,ISC)近100%系间穿越到三重态PSP*。该三重态PSP*的寿命为约123 μ s。如果存在牺牲还原剂(SR),三重态可以获得一个电子并且变成蛋白自由基状态PSP \cdot ,在不存在氧的条件下,含有二苯甲酮-丙氨酸(BpA)的蛋白自由基状态(PSP \cdot)的寿命大于1s。

[0067] (f) 提议的PSP2T光催化机制。ISC:系间跨越; S_1 :PSP的单激发态; T_1 :PSP的三重激发态(PSP*)。

[0068] 图5.a,BpA的结构;b,BpAChm的结构,BpAChm模拟PSP的发色团结构。c,BpA在405nm激光辐照之前和之后的UV-Vis光谱;d,BpAChm在405nm激光辐照之前和之后的UV-Vis光谱;在这两种情形中,在存在10mM连二亚硫酸盐的条件下,在用405nm激光笔辐照样品超过10分钟后,没有观察到二苯甲酮自由基。e,PSP1用单独的连二亚硫酸盐(10 mM)处理或单独的405nm激光辐照(10分钟)处理后的UV-Vis光谱。没有观察到PSP1光谱变化。

[0069] 图6.a,PSP1和PSP2用405nm激光辐照10分钟后的UV-Vis光谱;条件:50 μ M PSP,100mM Tris-HCl pH 7.0缓冲液,100mM Asc(抗坏血酸盐);b,在100mM Tris-HCl pH 7.0缓冲液中,在不存在Asc的条件下用405nm激光笔辐照10分钟,或在不存在激光辐照的条件下用100mM Asc处理,PSP2的UV-Vis光谱;在这两种情形中,没有观察到PSP2光谱变化,并且没有获得PSP2 \cdot 自由基形成;c,PSP1 \cdot 在不同pH下的UV-Vis光谱。在100mM不同pH值的缓冲液中:Tris-HCl(pH 6.0-8.0),Glycine-NaOH(pH9-10),用405nm激光笔辐照PSP1 10分钟得到PSP1 \cdot 。d,用Eu(II)-DTPA还原PSP2的UV-Vis光谱。没有观察到PSP2光谱变化,没有得到PSP2 \cdot 自由基形成。条件:65 μ M PSP2,100mM Tris-HCl pH 8.0缓冲液,5mM Eu(II)-DTPA。

[0070] 图7.二苯甲酮(BP)、BP-COOH、BP中性自由基、BP阴离子基团、PSP1发色团、PSP2发色团、PSP2中性自由基、PSP2阴离子基团的结构和BpAChm的命名。

[0071] 图8.PSP2在不同pH值缓冲液中的圆二色(CD)光谱。条件:将在100 mM不同pH值的缓冲液(即Tris-HCl(pH 6.0-8.0),甘氨酸-NaOH(pH 9-10.6),Carbonate-NaOH(pH 11.4-11.8))中的10 μ M PSP2放置在石英杯(200 μ L,1cm path)中,然后在室温用圆二色光谱仪测量光谱。

[0072] 图9.PSP2 \cdot 的形成是可逆的。条件:50 μ M PSP2,50mM NADH,100 mM Tris-HCl pH 7.0缓冲液。对于每个光周期,将样品先用405nm激光(100mW/cm²)辐照10分钟,然后测量525nm的吸光度(其表示PSP2 \cdot 的形成,对应于三个等吸光度点中的一个点),然后在下一个光周期开始之前在暗处温育20分钟。PSP2 \cdot 的可逆性形成表示,尽管PSP2 \cdot 可以与氧反应(这是几乎所有超还原自由基的共同特性),但是反应又在不破坏发色团的前提下回复产生基态PSP2。由于已知多种二氧化碳还原剂被氧不可逆地破坏,因此,这种特性对于催化剂的稳健性是重要的。

[0073] 图10.用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(实施例1合成的化合物7)修饰的PSP2单半胱氨酸突变体的LC-MS光谱。

[0074] a,PSP1-26C的MS表征。计算的分子量:27604Da;实测分子量:27606Da。

[0075] b,用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺修饰的PSP1-26C的MS表征。计算的分子

量:27893Da;实测分子量:27892Da。

[0076] c,用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺修饰的PSP2-95C的MS表征。计算的分子量:27899Da;实测分子量:27899Da。

[0077] d,用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺修饰的PSP2-95C 93Y97Y。计算的分子量:28030Da,实测分子量:28025Da。

[0078] e,用N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺修饰的PSP2的MS表征。计算的分子量:27646Da;实测分子量:27643Da。实测分子量与计算的分子量基本一致,这说明在PSP2中没有引入单个半胱氨酸突变时,N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺不能与PSP2缀合。进一步地,这也能够证明,对于引入单个半胱氨酸残基的PSP2变体,N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在该半胱氨酸残基上。

[0079] 图11.terpy、Ni(II)terpy、PSP2-95C-terpy、PSP2-95C-Ni(II)terpy和纯化的PSP2-95C-Ni(II)terpy的UV光谱。这些结果显示,当将8 μ M PSP2-95C-terpy与2当量的Ni(II)混合时,定量地形成PSP2-95C-Ni(II)terpy 复合物,如335nm峰所示。

[0080] 图12.残基147,151,95,155,26的 β -碳原子到PSP2发色团的距离分别为6.0,10.2,11.9,17.6,21.9 Å。

[0081] 图13.在使用配置了AM 1.5滤波器的130mW \cdot cm⁻²Xe灯光分解之前(a)和之后(b),包含0.4 μ M PSP2T1,0.8 μ M NiClO₄,1mM BIH(即,4-(2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯-1,2-二醇),1mM NaHCO₃的反应溶液的TEM图片。

[0082] 图14.sfYFP(SEQ ID NO:1)及本发明构建的各种sfYFP变体的氨基酸序列(SEQ ID NOs:2、4、6、8、10),其中变体第66位的“*”表示 BpA。

[0083] 序列表说明

[0084]

SEQ ID NO:	说明
SEQ ID NO: 1	超折叠黄色荧光蛋白(sfYFP)的氨基酸序列
SEQ ID NO: 2	sfYFP-BpA66的氨基酸序列
SEQ ID NO: 3	sfYFP-BpA66在大肠杆菌中表达的核苷酸序列
SEQ ID NO: 4	sfYFP-BpA66-Phe203(PSP1)的氨基酸序列
SEQ ID NO: 5	sfYFP-BpA66-Phe203(PSP1)在大肠杆菌中表达的核苷酸序列
SEQ ID NO: 6	sfYFP-BpA66-Asp203 Glu148(PSP2)的氨基酸序列

[0085]

- SEQ ID NO: 7 sfYFP-BpA66-Asp203 Glu148 (PSP2) 在大肠杆菌中表达的核苷酸序列
- SEQ ID NO: 8 PSP2-95C 的氨基酸序列
- SEQ ID NO: 9 PSP2-95C 在大肠杆菌中表达的核苷酸序列
- SEQ ID NO: 10 PSP2-95C93Y97Y 的氨基酸序列
- SEQ ID NO: 11 PSP2-95C93Y97Y 在大肠杆菌中表达的核苷酸序列
- SEQ ID NO: 12 超折叠黄色荧光蛋白 (sfYFP) 在大肠杆菌中表达的核苷酸序列

[0086] 需要说明的是,由于二苯甲酮-丙氨酸(BpA)不是天然氨基酸,在制作计算机可读形式的序列列表时不能显示这样的人工氨基酸,因此在序列表中SEQ ID NOs:2、4、6、8、10所示的sfYFP变体序列中,第66位仍显示Tyr,本发明人在<223>注明了“第66位Tyr突变为二苯甲酮-丙氨酸(BpA)”的信息。本领域技术人员根据本说明书记载的信息并结合图 14列出的变体序列,能够理解SEQ ID NOs:2、4、6、8、10所示的sfYFP 变体序列中,第66位实际为二苯甲酮-丙氨酸(BpA)。

具体实施方式

[0087] 下面参照具体的实施例进一步描述本发明,但是本领域技术人员应该理解,本发明并不限于这些具体的实施例。

[0088] 除非另外说明,实施例中所用的试剂、质粒等均可从市售渠道购买得到。

[0089] 材料和方法

[0090] 材料

[0091] 2-氨基-3-(4-苯甲酰基苯基)丙酸(BpA,简称二苯甲酮-丙氨酸)购自 Amatek Scientific company(中国苏州)。4-氨基-2,6,2-三联吡啶购自上海 UCHEM公司(中国上海)。BIH(即,4-(2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯-1,2-二醇)按照参考文献中的方法合成⁴¹。所有其他化学品购自 Sigma-Aldrich或J&K chemical并且无需进一步纯化而使用。硅胶色谱纯化使用硅胶60(230-400目,购自伊诺凯公司)进行。PCR试剂、T4DNA 连接酶和限制性内切核酸酶购自Fermentas。Ni-NTA亲和纯化试剂和纯化柱购自Qiagen。pEVOL-BpARS质粒购自Addgene(Plasmid#31190)。所用的引物和突变的基因由Sangon Biotech合成。

[0092] 分析方法

[0093] ¹H和¹³C NMR光谱在Bruker AMX-500仪器上记录,并且以四甲基硅烷的化学迁移作为基准迁移。所有的¹H NMR光谱以百万分之一(ppm)为单位报告,并且相对于DMSO信号(2.5ppm)测量。¹³C NMR光谱相对于残余的DMSO(40ppm)以ppm报告。化学品的质谱在配备了单个四极质量检测器和电喷射离子源的Waters LC-MS(Waters ACQUITY QDa)上运行。蛋白的质谱在Agilent 6100系列单个四极质谱仪(Agilent Technologies)上运行。蛋白纯化在AKTA UPC 900 FPLC系统(GE healthcare)上进行。吸收光谱使用紫外-可见光质谱仪(Agilent 8453,Agilent technologies,CA,USA)在室温记录。荧光光谱在装配了Varioskan Flash SkanIt软件2.4.3 RE(Varioskan Flash,Thermo Fisher Scientific

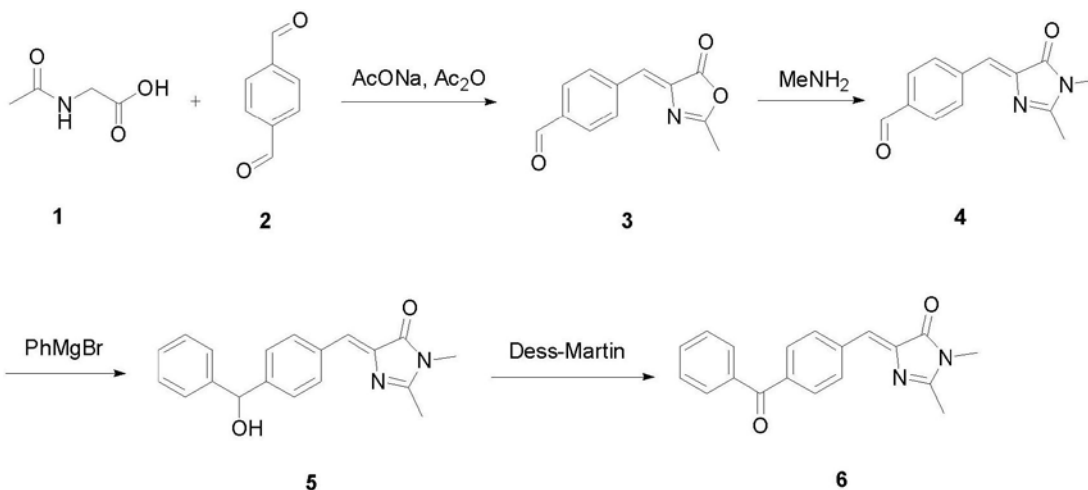
Inc) 的微量平板读取仪上记录。荧光衰减测量用时间相关的单光子计数 (time correlated single photon counting, TCSPC) 荧光分光计 (FL900 Edinburgh instruments Ltd.) 进行。纳秒时间分辨率的瞬时吸收光谱使用纳秒闪光光解设置的 Edinburgh LP980 光谱仪 (Edinburgh Instruments Ltd.) 检测。循环伏安法 (cyclic voltammetry, CV) 测量用 CH 仪器 600D 电化学系统 (CH Instrument, China) 进行。气相色谱 (gas chromatography, GC) 用配备了 TCD 和 HID 检测器的 SRI 多气相分析仪 (SRI Instruments, Model 8610C) 进行。圆二色 (circular dichroism, CD) 光谱用圆二色光谱仪 (Applied Photophysics Ltd, Chirascan Plus) 记录。上述实验均在中国科学院生物物理研究所进行。ESR 光谱用 154 Bruker EMX-plus X-band 光谱仪 (中国科学院化学研究所, 北京) 记录。透射电子显微镜 (TEM) 照片用 JEM-2100F 电子显微镜 (清华大学化学系分析中心) 拍摄。

[0094] 实施例 1. 相应化合物的合成和表征

[0095] 按照以下反应路线合成下述化合物, 用于检测本发明制备的可基因编码的人工光合作用蛋白质在光反应中形成的自由基的还原电势。

[0096] 下述合成反应中所用的试剂, 除非另外指明, 均购自百灵威化学试剂公司。

[0097] (E)-4-(4-苯甲酰苯亚甲基)-1,2-二甲基-1H-咪唑-5(4H)-酮 (BpAChm) (6) 的合成路线



[0099] (1) 4-((2-甲基-5-氧代咪唑-4(5H)-基亚基)甲基)苯甲醛 (3) 的合成

[0100] 将 1 (23.6g) 和 NaOAc (16.4g) 在 Ac_2O (100mL) 中的混合物在室温搅拌 1 小时, 然后加入 2 (26.8g)。将该混合物在室温搅拌 2 小时, 然后在 65°C 过夜。冷却至室温后, 向混合物中加入 H_2O (1L)。将混合物在室温搅拌 1 小时, 然后过滤。将得到的固体用 H_2O (1L) 和 MeOH (100mL) 洗涤, 然后在真空中干燥, 得到作为橙色固体的 3 (32g), 其可以不经进一步纯化直接用于后续步骤。

[0101] (2) 4-((1,2-二甲基-5-氧代-1H-咪唑-4(5H)-基亚基)甲基)苯甲醛 (4) 的合成

[0102] 向 3 (32g) 在 EtOH (100mL) 中的溶液中加入 NH_2Me (在 EtOH 中 40%, 100mL)。将混合物在室温搅拌 1 小时, 然后在 65°C 过夜。在去除溶剂后, 将残余物用硅胶色谱纯化, 用 PE 至 PE:EA=1:1 (v/v) 洗脱, 得到作为浅黄色固体的 4 (3.6g)。

[0103] 其中 PE 为石油醚, EA 为乙酸乙酯。

[0104] (3) 4-(4-(羟基(苯基)甲基)苯亚甲基)-1,2-二甲基-1H-咪唑-5(4H)-酮 (5) 的合成

[0105] 向4 (3.6g) 在THF (100mL) 中的溶液中, 在-78℃加入PhMgBr (在Et₂O中, 3M, 5mL)。将混合物在-78℃搅拌1小时, 然后在15℃继续搅拌1小时。向混合物中加入MeOH (50mL), 在减压下去除溶剂。残余物通过硅胶色谱纯化, 用PE至PE:EA=1:1 (v/v) 洗脱, 得到作为浅黄色固体的5 (2.1g)。

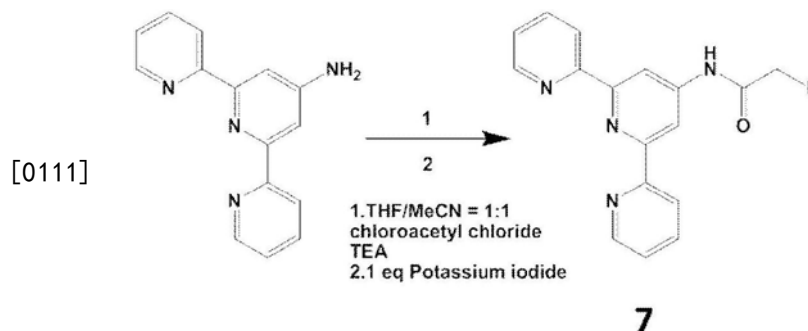
[0106] 其中PE为石油醚, EA为乙酸乙酯。

[0107] (4) 4-(4-苯甲酰苯亚甲基)-1,2-二甲基-1H-咪唑-5(4H)-酮(6)的合成

[0108] 向5 (2.1g) 在DCM (100mL) 中的溶液中, 加入Dess-Martin (5g, 购自 Alfa化学试剂公司)。将混合物在室温搅拌1小时, 然后用饱和NaHCO₃ (300 mL) 淬灭反应。分离有机层并用饱和Na₂SO₃ (100mL) 洗涤, 然后在减压下浓缩。残余物用硅胶色谱纯化, 用PE至PE:EA=i:1 (v/v) 洗脱, 产生粗产物6 (1.1g)。将其进一步纯化并用EA:MeOH=9mL:1滴定, 产生作为浅黄色固体的纯的产物6 (0.75g)。

[0109] MS (ESI): C₁₉H₁₆N₂O₂计算质量需要m/z: 304.12, 实测[M+1]⁺m/z 305.02; [M+Na]⁺m/z 327.02. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) 8.34 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.77 (m, 4H), 7.75 (m, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.02 (s, 1H), 3.1 (s, 3H, -CH₃), 2.37 (s, 3H, -CH₃); ¹³C-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 195.7, 170.3, 166.7, 141.0, 138.4, 137.6, 137.2, 133.3, 132.1, 130.2, 130.1, 129.1, 123.3, 26.8, 15.9。

[0110] N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (Iodoacetamidoterpyridine, 7) 的合成



[0112] (1) N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-氯乙酰胺的合成

[0113] 将4-氨基-2,6,2-三联吡啶 (240mg, 1mmol, 购自上海UCHEM公司) 用由四氢呋喃和乙腈组成的混合物溶剂 (THF/MeCN=1mL:1mL) 溶解。向溶液中加入三乙胺 (500μL, 5eq.) 并且在氮气气氛下搅拌1小时。然后逐滴滴入氯乙酰氯 (200μL, 在1mL MeCN中)。将混合物搅拌2小时。将得到的溶液用乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取, 用5% NaHCO₃ 溶液洗涤。收集有机相, 用无水Na₂SO₄ 干燥, 并蒸发, 从而得到棕色固体 (300mg)。该产物无需进一步纯化用于下一步骤 ([M+1]⁺m/z 325)。

[0114] (2) N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺的合成

[0115] N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-氯乙酰胺 (300mg) 用由四氢呋喃和乙腈 (THF:MeCN=1mL:10mL) 组成的混合溶剂溶解。加入碘化钾 (500mg), 并将混合物90℃回流1小时。将得到的混悬液浓缩并通过硅胶柱分离 (洗脱剂CH₂Cl₂:CH₃OH=20mL:1mL), 得到作为黄色粉末的产物 (150mg), 产率为35%。

[0116] ¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) 8.70 (d, 2H), 8.66 (s, 2H), 8.58 (d, 2H), 8.00 (t, 2H), 7.49 (t, 2H), 3.89 (s, 2H); ¹³C-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 168.52, 156.23, 155.10, 149.56, 148.18, 138.07, 125.03, 121.33, 110.51, 1.43; MS (ESI): C₁₇H₁₃IN₄O 计算的质量需要m/z:

416.01, 实测 $[M+1]^+_{m/z}$ 417.02。

[0117] N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺镍(II)复合物合成

[0118] 将 $Ni(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 的乙腈溶液 (500 μ L, 20mM) 添加到含有 N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (10 μ mol) 的管中。将混合物用水 (500 μ L) 稀释至 1ml, 并且超声 10 分钟, 从而得到澄清的黄色-橙色储液。

[0119] $C_{34}H_{26}NiI_2N_8O_2$ 计算的质量需要 m/z : 890.96, 实测 $[M]^{2+}_{m/z}$ 445.46。

[0120] 实施例 2. sfYFP 突变体的构建

[0121] 本发明中所述的所有表达荧光蛋白 (FP) 变体的载体都用 pET22b(+) 载体 (购自通用生物系统 (安徽) 有限公司) 克隆并表达。PCR 反应 (50 μ L) 包含 10 pM 引物, 50 ng 模板 DNA, 1 \times 高保真度 DNA 聚合酶缓冲液, 1 单位高保真度聚合酶 (Fermentas), 0.2 mM dNTP 和 1.5 mM $MgCl_2$ 。DNA 扩增用 DNA 热循环仪进行: 初始变性 (94 $^{\circ}C$, 1min); 接着是 30 个链反应循环: 94 $^{\circ}C$ 1min, 60 $^{\circ}C$ 1min, 68 $^{\circ}C$ 1min; 最后在 68 $^{\circ}C$ 延伸 10min。

[0122] 包含超折叠黄色荧光蛋白 (superfolder yellow fluorescent protein, sfYFP, 氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示) 编码序列 (SEQ ID NO:12) 的载体 pET22b(+) 用作产生不同 sfYFP 突变体的模板。所有的构建体和它们的诱变都通过 DNA 测序分析进行验证。

[0123] 将构建体 pET22b-sfYFP (其中 sfYFP 编码序列由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成) 与 BpAtRNA 合成酶质粒 pEVOL-BpARS (质粒购自 Addgene (Plasmid#31190), 使用方法还可参见参考文献 38-39) 共转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中, 进行非天然氨基酸掺入。具体地, 将构建体 pET22b/sfYFP-TAG66 突变体与 pEVOL-BpARS 共转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中。所述 pEVOL-BpARS 质粒携带 BpA 选择性詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 酪氨酸 tRNA 合成酶和詹氏甲烷球菌酪氨酸琥珀抑制子 tRNA ($MjtRNA_{Tyr}^{CUA}$), 从而允许向 sfYFP 突变体的第 66 位位点特异性掺入 BpA, 得到的突变体蛋白命名为 sfYFP-BpA66, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0124] 在此基础上, 通过改变表达载体中 sfYFP 编码序列的相应密码子核苷酸, 而进一步将 sfYFP 中第 203 位酪氨酸 (Tyr) 突变为苯丙氨酸 (Phe), 该双重突变体 sfYFP-BpA66-Phe203 命名为 PSP1, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。更进一步地, 将 sfYFP 中第 203 位酪氨酸 (Tyr) 突变为天冬氨酸 (Asp), 且将第 148 位组氨酸 (His) 突变为谷氨酸 (Glu) 的三重突变体 sfYFP-BpA66-Asp203 Glu148 称为 PSP2, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0125] 在 PSP2 的基础上, 将第 95 位谷氨酸 (Glu) 突变为 Cys (C), 得到 PSP2-95C 突变体, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。该突变体在用 N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (实施例 1 合成的化合物 7) 修饰后 (N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在第 95 位的半胱氨酸上), 在二价镍离子的存在下得到的最终缀合物命名为 PSP2T1, 检测得知 PSP2T1 具有较高的二氧化碳还原活性。

[0126] 为了研究局部质子供体的存在是否能够提高催化效率, 发明人在 PSP2-95C 突变体的基础上, 将第 93 位缬氨酸 (Val) 和 97 位苏氨酸 (Thr) 均突变为酪氨酸 (Tyr, Y), 得到突变体 PSP2-95C93Y97Y, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示。该突变体在用 N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺 (实施例 1 合成的化合物 7) 修饰后 (N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺特异性缀合在第 95 位的半胱氨酸上), 在二价镍离子的存在下得到的最终缀合物命名为 PSP2T2, 其表现出显著提高的一氧化碳转化数 (TON) (图 3c/d)。本发明人计算得知 PSP2T2

具有2.6%的量子产率,用于二氧化碳向一氧化碳的光催化性还原(表2-3)。

[0127] 进行蛋白表达时,将已经转化了相应的重组表达载体的单个菌落在补充有氨苄青霉素(100 μ g/mL,购自Sigma-Aldrich)和氯霉素(25 μ g/mL,购自Sigma-Aldrich)的LB培养基(4mL,购自Sigma-Aldrich)中在37 $^{\circ}$ C生长过夜。取1mL过夜培养物接种到补充有氨苄青霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(25 μ g/mL)以及BpA(1mM)的100mL液体LB培养基中。然后将细胞在37 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀为1.1,接着添加0.02%阿拉伯糖(购自Sigma-Aldrich)和1mM异丙基 β -D-1-半乳糖硫吡喃糖苷(IPTG,购自Sigma-Aldrich)诱导蛋白表达。继续培养4-12小时,收集细胞并在-70 $^{\circ}$ C冷冻,备用于蛋白纯化。

[0128] 进行蛋白纯化时,将细胞混悬在裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 7.8, 150mM NaCl,和10mM咪唑)中,通过超声处理裂解。离心后,将上清上样到Ni-NTA柱(Histrap 5ml, GE healthcare)上。用5ml洗涤缓冲液(50 mM Tris-HCl,pH 7.8,150mM NaCl,和50mM咪唑)洗涤柱子两次,然后用洗脱缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 7.8,150mM NaCl,和250mM咪唑)洗脱捕获的蛋白。

[0129] 进行结晶时,将纯化的各种蛋白在包含20mM HEPES-NaOH,pH 7.5,10mM β -ME的缓冲液中的溶液浓缩至10mg/mL。加入0.5mg/mL 胰蛋白酶(TPCK处理的)在37 $^{\circ}$ C温育1.5小时。通过加入1mM PMSF(苯基甲基磺酰氟,购自Sigma-Aldrich)而阻断降解反应。将上述混合物再次上样到Ni-NTA琼脂糖亲和树脂(购自Sigma-Aldrich)上,以去除包含完整的HIS6标签的未消化的蛋白。将消化的蛋白用Sephadex凝胶柱层析(Superdex 75 10/300GL;GE Healthcare)纯化到含有20mM HEPES-NaOH,pH 7.5的缓冲液中,并且浓缩至 \sim 30mg/mL,通过SDS-PAGE检验。通过将1 μ L蛋白样品(20mg/mL)与等体积的结晶缓冲液(基态:25% PEG3350,0.2M MgCl₂,0.1M Bis-Tris pH 5.5;自由基态:15%PEG3350,0.1M苹果酸,pH 6.5)混合,利用座滴蒸汽扩散法(sitting-drop vapor diffusion method)在16 $^{\circ}$ C约一周出现晶体。然后将晶体快速冷冻在液氮中。

[0130] 关于上述突变体晶体结构的确定,衍射数据由上海同步辐射光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility,SSRF)用beamlines B17U或 BL18U采集。数据处理和约简使用HKL2000package进行。使用sfYFP(PDB code:1F0B)的原子坐标作为检索模型,用CCP4套装(一种大分子结构晶体结构解析软件, Collaborative Computational Project No.4 Software for Macromolecular X-Ray Crystallography, <http://www.ccp4.ac.uk/>)的Molrep进行分子替换,解析PSP2 \cdot (自由基态)的结构。

[0131] 数据采集和结构精修统计学数据总结在下表1中。蛋白结构示意图用PyMOL(<http://www.pymol.org>)产生。PSP2 \cdot (自由基态)晶体结构的原子坐标和结构因数已经在Protein Data Bank中登记(PDB codes:5YR3)。

[0132] 表1.PSP2 \cdot 的X射线衍射的统计学数据。

数据采集

Data sets	PSP2• (pH 5.0)
Space group	$P 4_12_12$
Cell dimensions	
a, b, c (Å)	51.69, 51.69, 178.875
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Resolution range (Å)	50 – 1.89
Average Redundancy	6.6
$I / \sigma I$	17.7
Completeness (%)	99.4
R_{merge} (%) ^a	7.2

[0133]

Refinement

Resolution (Å)	29.417 – 1.89
$R_{\text{cryst}} / R_{\text{free}}$ (%)	81.7
No. of total reflections	37512 (189)
r.m.s. deviations	
bond lengths (Å)	0.008
bond angles (°)	1.052
Ramachandran plot	
most favored regions (%)	95.95
additionally allowed (%)	3.6
generously allowed (%)	0.45

[0134] 使用Agilent 8453 UV-可见光分光光度计,在室温检测各种PSP 突变体蛋白的UV-Vis光谱和确定PSP2•的pKa。UV-Vis光谱和pKa 数据能够证明PSP突变体蛋白在碱性条件转化为去质子化状态。

[0135] 使用Agilent 8453 UV-可见光分光光度计,在室温检测PSP2自由基(PSP2•)的形成是可逆的。在存在50mM NADH的条件下,将在100mM Tris-HCl pH 7.0缓冲液中的50μM PSP2蛋白用405nm 激光辐照10分钟,然后使用Agilent 8453 UV-可见光分光光度计(石英杯,100μL,1cm path)在室温记录UV-Vis光谱。对于每个光周期,将样品先用405nm激光

(100mW/cm²) 辐照10分钟,然后测量 525nm的吸光度(其表示PSP2·的形成,对应于三个等吸光度点中的一个点),然后在下一个光周期开始之前在暗处温育20分钟。PSP2·的可逆性形成表示,尽管PSP2·可以与氧气反应(这是几乎所有超还原自由基的共同特性),但是反应又在破坏发色团的前提下回复产生PSP2。由于已知多种二氧化碳还原剂被氧不可逆地破坏,因此,这种特性对于催化剂的稳健性是重要的。

[0136] 通过循环伏安法(cyclic voltammetry,CV)测量还原电势,还原电势数据能够间接证明PSP2自由基的还原力。测量用CH Instruments 600D potentiostat(仪器购自上海辰华仪器有限公司)进行。在4℃,将在0.1M NBu₄PF₆ DMF溶液中的2mM BpAChm溶液放置在具有Au工作电极、Ag/AgCl参比电极和Pt辅助电极的3-电极室中。测量之前,将体系用Ar净化15分钟。CV参数如下:扫描速率:10mV/s;样品间隔:1mV;灵敏度:10μA/V;安静时间:4s;温度:0℃。

[0137] 进行电子自旋共振(electron spin resonance,ESR)实验以进一步表征自由基PSP2·的产生。在50mM NADH的存在下,将在100 mM Tris-HCl pH 8.0缓冲液中的45μM PSP2用405nm激光辐照10 繁殖后,通过UV-Vis光谱定量确定产生PSP2自由基的产率为12%。在405nm激光辐照之前,PSP2蛋白溶液呈现浅黄色,在405nm激光辐照后,蛋白溶液变成深红色,这表明形成了自由基。然后,在 Bruker E500光谱仪上,在室温对深红色的光处理的蛋白样品记录 X-波段ESR光谱。ESR捕获参数如下:调节频率:30-100kHz;微波功率:0.05-10mW;调节幅度:2G。

[0138] 为了确定PSP光激发后各种中间体的吸收光谱及寿命,使用Edinburgh LP980分光计(Edinburgh Instruments Ltd.)的纳秒闪光光解装置结合小巧的Q-switched Nd:YAG激光器(Q-smart 850,Quantel, France)测量纳秒时间分辨率的瞬时吸收光谱。探头为150W脉冲的氙弧灯,用于从几纳秒到1ms的动力学和光谱测量。样品的光解使用355nm的单次闪光激光激发(single-flash laser excitation)实现(1 Hz,10mJ/pulse,50mm² spot area,fwhm≈7ns)。探测光来自450W 脉冲的氙气灯。使用单个检测器(PMT R928P)记录瞬时信号,使用示波器记录动力学痕迹,使用ICCD检测器记录时间分辨光谱。数据用LP900软件进行分析。在355nm波长具有0.30D的吸光度的样品在测量前先用Ar脱气处理约10分钟。

[0139] 将衰减曲线拟合为下述等式,列出了得到的寿命值。

$$[0140] \quad y = y_0 + A_1 e^{-x/\tau_1} + A_2 e^{-x/\tau_2}$$

[0141] 使用0mM抗坏血酸盐 $\tau = 123\mu\text{s}$;

[0142] 使用50mM抗坏血酸盐 $\tau_1 = 123\mu\text{s}$; $\tau_2 = 53\mu\text{s}$

[0143] 使用100mM抗坏血酸盐 $\tau_1 = 123\mu\text{s}$; $\tau_2 = 34\mu\text{s}$

[0144] 使用150mM抗坏血酸盐 $\tau_1 = 123\mu\text{s}$; $\tau_2 = 24\mu\text{s}$

[0145] 恒定速率计算如下:

$$[0146] \quad k = (1/\tau_2 - 1/\tau_1) / C_{\text{Asc}}$$

[0147] 使用50mM抗坏血酸盐 $k = (0.0189 - 0.00813) * 10^6 / 0.05\text{mM} = 2.2 * 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

[0148] 使用100mM抗坏血酸盐 $k = (0.0294 - 0.00813) * 10^6 / 0.1\text{mM} = 2.1 * 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

[0149] 使用150mM抗坏血酸盐 $k = (0.0417 - 0.00813) * 10^6 / 0.15\text{mM} = 2.15 * 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

[0150] $k_{\text{average}} = 2.2 * 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

[0151] 实施例3.sfYFP突变体的活性检测

[0152] 3.1 PSP2单半胱氨酸突变体的三联吡啶修饰

[0153] 将在反应缓冲液(150mM Tris-HCl缓冲液pH 8.8,30%DMF)中的PSP2的单半胱氨酸突变体(具体参见表3,50 μ M)在室温用100 μ M三(2-羧基乙基)膦(TCEP)处理5分钟。然后,通过加入250 μ M N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(实施例合成的化合物7)在室温进行标记反应12小时。在三联吡啶修饰后,通过针对10mM Tris-HCl pH 8缓冲液透析(Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit 3K,至少3次)去除未结合的三联吡啶分子。然后,通过LC-MS分析得到的突变体。图11显示了定量形成PSP2-95C-terpy复合物。

[0154] 3.2光催化性二氧化碳还原

[0155] 光催化性二氧化碳还原在用波形塞密封的玻璃顶空瓶(总体积为10ml)中进行。对于典型的反应,反应溶液体积为200 μ L:将在100mM Tris-HCl缓冲液(pH 8.0,50%DMF,以增加在纯水中的4-(2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯-1,2-二醇(BIH)衍生物溶解性)中的三联吡啶镍配合物修饰的40 μ M PSP2单半胱氨酸突变体蛋白(例如,PSP2T1或PSP2T2)与80 μ M Ni(ClO₄)₂、100mM NaHCO₃、100mM 4-(2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯-1,2-二醇(BIH)牺牲还原剂(SR)一起添加到玻璃顶空瓶中。样品用氩气(Ar)鼓泡10分钟,然后用具有AM 1.5滤波器的300W Xe灯(MICROSOLAR300,北京泊菲莱科技有限公司)辐照,以模拟太阳光谱。使用截止滤光片(cutoff filter,UVCUT400)实现可见光($\lambda > 400$ nm)辐照。使用气相色谱(GC)(SRI instruments,8160C GC)分析光催化的气体产生率。

[0156] 3.3计算光子(光子命中/分子/秒)⁴²

[0157] 按照参考文献42(具体参见第60-61页)的方法,计算光子命中/分子/秒。

[0158] 光子通量或强度I由下式计算:

$$[0159] \quad I = E * N_A$$

[0160] 其中I是每秒钟碰撞单位表面积的光子数,E是每秒钟每单位面积的Einsteins数, N_A 是Avogadro常数,数值为 $6.02 * 10^{23}$ 。

[0161] 用PSP2替换吸收的阳光强度(400-450nm),本发明人得到: $I = 1.32 * 10^{20}$ 个光子 $m^{-2}s^{-1}$;其对应于1.32个光子 $\text{\AA}^{-2} s^{-1}$ 。

[0162] 对于sfYFP蛋白,其结构大致为正正方形的,正方形每边长 $\sim 3.5 \text{\AA}$,其每秒钟被约16个光子照射,但是这些光子没有全部被吸收。为了确定吸收多少个光子,应该按照下述等式计算光敏剂的靶标尺寸:

$$[0163] \quad \sigma = 2303 \epsilon / N_A$$

[0164] 其中 σ 表示靶标尺寸, ϵ 表示摩尔消光系数, N_A 表示Avogadro常数。

[0165] 最大吸收波长375nm处的消光系数为 $23mM^{-1}cm^{-1}$ 。在吸收区(400nm至450nm)的平均消光系数为约 $3.65mM^{-1}cm^{-1}$ 。包含BpA的蛋白的平均尺寸 σ 为 $1.39 * 10^{-17}cm^2$,即 0.139\AA^2 。则光子命中/分子/秒为 $I * \sigma$ 个光子 s^{-1} , $Hits = I * \sigma = 1.32$ 个光子 $\text{\AA}^{-2} s^{-1} * 0.139 \text{\AA}^2 = 0.18 s^{-1}$ 。

[0166] 3.4确定量子效率值

[0167] 使用下述等式计算催化性光氧还反应的量子效率(quantum efficiency, QE)值:

$$[0168] \quad QE = \frac{TON_{CO} * 2}{Hits} * 100\%$$

[0169] 其中TON_{co}表示一氧化碳转化数,Hits为3.3节计算的Hits。

[0170] 利用关于本发明人的系统体积的理想气体法则,将通过气相色谱检测的一氧化碳浓度(以ppm为单位)转化成产生的一氧化碳总摩尔数。因为产生一分子的一氧化碳需要2个电子,因此在计算时包括因数2。为了确定入射光子的通量,由包含BpA的蛋白突变体的吸光度确定光子波长(400-450nm),计算通量。

[0171] 计算基于3小时光解后由PSP2T2吸收的光子数,计算的量子效率(QE)为2.6%。

[0172] 关于入射的总太阳光子数,按照参考文献43中所述的方法,计算基于入射光子的量子效率(QE):

$$[0173] \quad QE = \frac{\text{CO molecules} \times 2}{\text{incident photons}} \times 100\%$$

[0174] 此处,入射光子数(incident photons)可由入射光子通量 1.2×10^{21} 个光子 $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (在 130mW cm^{-2})计算,并且在本发明人的研究情形中,照射面积为 1cm^2 。在3小时光解后,产生 $0.2 \mu\text{mol}$ 一氧化碳(CO),反应体系的总体积为 0.2ml 。基于全部的照射光子数,关于PSP2T2体系计算的QE为 0.0067% 。

$$[0175] \quad QE = \frac{\frac{0.2 \mu\text{mol}}{3 \text{h}} \times 6.022 \times 10^{23} \times 2}{1.2 \times 10^{21} \text{ photons} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \times 1 \text{cm}^2} \times 100\%$$

[0176] 结果和讨论

[0177] 为了设计光催化性二氧化碳还原酶,本发明人首先将荧光蛋白(FP)¹³⁻¹⁴转换成光敏蛋白(photosensitizer protein,PSP)(图1)。为了实现这一目标,必须满足下述条件:

(1) PSP必须能够有效地吸收可见光;(2)当吸收光子时,PSP必须转化成能够较长久存在的光激发态(PSP*),从而促进电子转移反应,这导致PSP自由基(PSP·)的形成;(3)PSP·必须是一种强还原剂,能够驱动二氧化碳还原催化剂的还原,由于二氧化碳具有很高的惰性,二氧化碳还原催化剂的还原通常需要高的超电势⁵。由于天然荧光蛋白通常仅具有纳秒激发态寿命¹⁴,存在的时间太短而不能允许长距离的电子转移,本发明人通过利用遗传密码表达¹⁵⁻¹⁶用二苯甲酮-丙氨酸(BpA,图1b)替换超折叠黄色荧光蛋白(superfolder yellow fluorescent protein,sfYFP,图2-3)中的发色团残基Tyr66而改造FP发色团。sfYFP通过其三肽Gly65-Tyr66-Gly67的自发性催化转化而产生高荧光性的对-羟基苯亚甲基-5-咪唑啉酮(p-HBI)种类。已知二苯甲酮以接近100%的量子效率从单线激发态系间跨越到三重态,所述三重态具有的寿命是原来的 10^5 倍,这允许发生牺牲还原剂(SR)还原¹⁷⁻²¹。本发明人设想在包含BpA66的sfYFP突变体中,三肽Gly65-BpA66-Gly67可以自发催化性转化成包含(E)-4-(4-苯甲酰苯亚甲基)-1,2-二甲基-1H-咪唑-5(4H)-酮(BpAChm,结构如图1f所示)的发色团,其应该以高量子效率系间跨越到三重态。

[0178] 本发明人设想,一旦FP发色团被光化学还原,应该观察到颜色变化。为了检验这一设想,本发明人首先将BpA掺入到sfYFP的第66位,并且在存在 10mM 连二亚硫酸钠的条件下,用 405nm 激光(100mW/cm^2)辐照所述突变体蛋白。由于sfYFP的203位氨基酸残基是酪氨酸,其与PSP发色团由于形成 π -堆积(π -stack)而发生了很快的电子转移过程,因此在光辐照后不能检测到PSP·。这可能是由于从Tyr203到PSP*的电子转移和随之而来的快速电荷结合。然后,本发明人将Tyr203突变成Phe。出乎意料地,sfYFP-BpA66-Phe203双重突变体(PSP1,SEQ ID NO:4)在激光辐照后30秒发生颜色变化,从黄色变成红色(图1b,图5)。辐

照导致390nm峰消失和在555nm与765nm出现两个新峰,这表明已经发生了光化学还原反应²²。产生的光化学产物称为PSP1•。

[0179] 由于连二亚硫酸盐是一种活细胞中不会产生的强还原剂(在pH 7, $E^{\circ} = -436\text{mV}$),然后本发明人研究较弱的生物相关还原剂能否促进PSP1的光化学还原。本发明人发现,抗坏血酸钠不能驱动PSP1的光化学还原。为了提高PSP*的氧化电势,以使其能够接收来自生物相关的牺牲还原剂(SR)的电子从而产生PSP•,本发明人突变残基Phe203和His148,靠近PSP1发色团的残基突变为天冬氨酸、谷氨酸或赖氨酸。这些残基突变成带电荷残基能够通过静电和氢键相互作用显著调节PSP发色团还原电势^{1,2}。然后在抗坏血酸盐的存在下用405nm激光辐照这些突变体PSP蛋白,发现 sfYFP-BpA66-Asp203Glu148 (PSP2, SEQ ID NO: 6) 在405nm激光辐照后从黄色变为红色(图6)。这些结果表明,PSP2利用生物相关的牺牲还原剂,进行了有效的光化学还原反应,产生了PSP2•。

[0180] 然后,本发明人在不同pH条件下进行PSP2•的UV-Vis滴定。如图1c和1d所示,尽管PSP2•在接近中性的pH下在500nm有强峰,但是在光照后555nm和765nm出现新峰,并且随着pH升高,新峰升高。观察到这些等吸收点分别在525nm、680nm和730nm处,这表明在滴定过程中仅存在两种化学种类。这些结果表明,在中性pH,PSP2•作为中性自由基($pK_a = 10.6$)存在。相反,从pH 6至10,PSP1•的UV-Vis光谱保持不变,这表明PSP1•在中性pH是阴离子基团(图6和7)。在pH 6-11.8,PSP2的CD光谱显示二级 β -片层结构没有变化,表明在整个pH滴定过程中,蛋白保持正确折叠(图8)。这些结果表明PSP2*是优于PSP1*的氧化剂。残基Asp203/Glu148可以与电子转移相似的速率将质子转移到PSP2*。这种质子偶联的电子转移²³⁻²⁴(proton coupled electron transfer, PCET)避免产生高能量阴离子基团中间体,降低PSP•态能量,并且因此增加PSP*与PSP•之间的能量差,这将加速从SR到PSP*的电子转移速率,形成PSP•。

[0181] 为了进一步表征光激发导致产生PSP2自由基,本发明人收集了X-波段电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)数据,所述数据表明,在405nm激光辐照后(非在辐照前),在 $g = 2.006$ 的强峰和 $\sim 22\text{Gauss}$ 的峰-到-峰宽度(图1e),这证明了在PSP2•中形成了典型的有机自由基基团。

[0182] 为了表征PSP2的还原电势,本发明人在水溶液中进行了蛋白电化学检测。然而,由于PSP2的还原电势低,在水氧化还原前的还原电势区间没有观察到与蛋白还原相对应的显著信号。然后,本发明人合成了模拟PSP2发色团的小分子BpAChm(图1f)。在DMF溶剂中进行的循环伏安法(CV)实验证明,BpAChm在 -1.46V 和 -2.05V 具有两个还原峰,这与BpAChm的1e和2e还原相对应²²(图1f)。由于DMF不是蛋白内部环境的良好模拟物, $E \sim -1.46\text{V}$ 值不能准确表示PSP2•相同的还原电势。在这种情形下,本发明人使用强还原剂铈(II)二乙烯三胺五乙酸酯(Eu(II)-DTPA,购自Sigma-Aldrich)(在pH 8, $E^{0'} = -1.14\text{V}$)²⁵,检测PSP2能否被还原。UV-Vis光谱显示,即使使用80倍过量的Eu(II)-DTPA作为还原剂,也没有PSP2•吸收峰出现(图6d)。根据这些数据,本发明人可以推测出PSP2•的还原电势小于 -1.14V 。

[0183] 为了检验PSP2•是否对氧敏感,本发明人首先通过光辐照产生PSP2•,然后将其在空气存在下在100mM Tris-HCl pH 7.0缓冲液中温育20分钟。如图9所示,PSP2•与氧反应,又产生PSP2。这种光循环可以重复多次。PSP2•的可逆形成表明PSP2•与氧反应不会不可逆地破坏发色团。由于已知多种二氧化碳还原催化剂被氧不可逆地破坏,因此这种特性

对于基于PSP的催化剂的稳健性是重要的。

[0184] 为了表征由于光化学还原导致的结构变化,本发明人通过X射线结晶性以 1.8 \AA 的分辨率确定了PSP2·的结构。在405nm激光辐照的条件下,在3分钟内完成X射线衍射数据采集。本发明人证实了在整个数据采集过程中,晶体保持为深红色(图2a/b)。在光化学还原之前,残基BpA66中的两个苯环采用扭曲的构象,二面角为 58° (图2c)。类似地,二苯甲酮中两个苯环之间的二面角为 56° ²⁶,这表明这两个苯环不形成共轭 π -电子体系。然而,在自由基状态(PSP2·), BpA66中的一个苯环进行 8.7 \AA 的明显旋转(图2e),两个苯环之间的二面角减小了 29.1° (图2d),导致形成延长的共轭 π -电子体系,和显著红移的UV-Vis光谱。据本发明人所知,这是关于质子化及中性二苯甲酮自由基的晶体结构的首次报道。关于在PSP2·蛋白刚性结构笼中笼住的具有超还原力二苯甲酮自由基的详细的结构信息为使用这种有力的试剂驱动挑战性的酶反应提供了必要的了解。

[0185] 为了将PSP转化为光敏二氧化碳还原酶,本发明人利用镍-三联吡啶复合物²⁷($E^0 = -1.0\text{V}$ (Ni (II/I)); $E^0 = -1.18\text{V}$ (基于配体的还原)),其选择性的电催化二氧化碳还原为一氧化碳(文献27)。为了促进PSP与催化剂之间有效的电子转移,本发明人合成了N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(化合物7,实施例1)。通过在PSP2不同位点引入半胱氨酸突变, N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(化合物7)位点特异性缀合到PSP2上(得到LC-MS光谱证明,见图10,化合物7 特异性与引入的半胱氨酸缀合)。然后,本发明人测定了这些半胱氨酸突变体在二价镍离子存在下催化光催化性二氧化碳还原反应的效率。向修饰的PSP2突变体蛋白中加入Ni(C10₄)₂、NaHCO₃和4-(2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯-1,2-二醇(BIH)作为牺牲还原剂。对该定量地形成PSP2-三联吡啶镍(II)复合物(图11),利用日光模拟器(波长 $\lambda > 400\text{nm}$)辐照样品12小时。如图3b所示,尽管PSP2-147C突变体表现出低一氧化碳产生活性(转化数(TON) = 11),但是,随着催化剂/发色团距离从 6.0 \AA 增加为 11.9 \AA (图12),催化活性增加,在PSP2-95C中达到最高水平(TON = 75)。但是催化剂/发色团距离的进一步增加导致一氧化碳产生降低(图3b)。在所有情形中,没有检测到H₂或HCOOH。这些结果表明,有效的光催化性二氧化碳还原需要最优的催化剂/发色团距离。由于PSP2-95C突变体在被三联吡啶镍(II)配合物修饰后具有较高的二氧化碳还原活性,将其称为PSP2T1。在不存在Ni(II)、NaHCO₃、BIH、BpA66掺入或PSP与N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(化合物7)之间共价连接的情况下,没有显著量的一氧化碳产生,这表明上述所有成分都是光催化性二氧化碳还原所必需的(图3c)。为了验证在光解过程中是否形成异源粒子,对光解之前和之后的样品进行了透射电镜(TEM)实验。如图13所示,光解之前和之后样品的TEM照片相似,表明在光解过程中没有产生异源粒子。这些结果证实了光化学产生的PSP2·能够还原镍-三联吡啶复合物($E^0 = -1.0\text{V}$),因此PSP2·具有低于 -1.0V 的还原电势。

[0186] 为了研究局部质子供体的存在是否提高催化效率¹²,本发明人设计并产生突变体PSP2-95C93Y97Y(SEQ ID NO:10)。本发明人设想靠近催化剂三联吡啶镍配合物共价连接的95C存在两个酪氨酸残基可能作为局部质子供体促进向二氧化碳底物的质子偶联的电子转移,这将降低二氧化碳还原的能量障碍⁵。实际上, PSP2-95C93Y97Y被催化剂N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(化合物7)修饰后,在二价镍离子的存在下(即,得到PSP2T2)表现出显著提高的TON(图3c/d)。本发明人计算得知PSP2T2具有2.6%的量子产率,用于二氧化

碳向一氧化碳的光催化性还原(表2-3)。相反,使用CdS纳米棒作为光敏剂和使用相同的镍-三联吡啶催化剂,仅观察到0.28%的CO₂/CO转化量子产率²⁷。此处,与CdS光激发态相比,PSP2•的还原电势低得多,准确控制发色团/催化剂距离的能力和催化剂微环境的优化引起效率提高九倍。

[0187] 为了研究PSP机制,本发明人测量了光激发产生的瞬态物种的瞬时吸收光谱。当用355nm激光辐照PSP2时,本发明人观察到在380nm基态吸收的回复,在430nm的新峰的衰减,这表明形成了PSP2三重激发态(PSP2*,图4a/b)。PSP2*的衰减寿命为123μs,约为荧光蛋白单线激发态寿命的10⁵倍,并且是诸如三(联吡啶)钌(II)卤化物([Ru(bpy)₃]²⁺) (~0.5μs)的光敏剂的三重激发态寿命²⁸的200多倍。PSP2*的长的寿命对于促进电子供体与PSP2之间的有效电子转移反应是重要的。瞬时吸收光谱表明,随着抗坏血酸盐浓度升高,PSP2*寿命降低,并且在500-560nm出现新峰。这些结果表明,PSP2*与抗坏血酸盐反应产生PSP2•,二级速率常数为2.2×10⁵M⁻¹s⁻¹(图4c/d)。如果催化剂三联吡啶镍配合物过于靠近发色团,正向电子转移和电荷重组都快速发生,这防止形成三联吡啶镍配合物的2e还原态。如果三联吡啶镍配合物远离发色团,则从PSP2*到三联吡啶镍配合物的电子转移太慢而不同支持有效的二氧化碳还原。催化剂与发色团之间的距离必须恰好(表3),从而使得PSP2*被牺牲还原剂还原后,催化剂被一个电子还原,从PSP2•到三联吡啶镍配合物的第二电子转移竞争性抑制电荷重组(图4e/f)。此处,使用微小蛋白作为自组装光催化单元的优点明显可见:通过定向诱变可以准确和便利地设计催化剂/发色团距离和它们的微环境,从而优化催化剂性能。

[0188] 表2.PSP2T1和PSP2T2的转化数(TONs)和量子效率(QE)数据

	辐照时间 (hrs)	TONs (PSP2T1)	TONs (PSP2T2)	PSP2T1 (QE %)	PSP2T2 (QE %)
	0	0	0	0	0
[0189]	3	14.1	25.5	1.5	2.6
	6	29.6	43.7	1.5	2.2
	12	74.8	86.7	1.9	2.2
	24	97.4	120	1.3	1.5

[0190] 表3.反应条件和评价用催化剂N-(2,6,2-三联吡啶-4-基)-碘乙酰胺(化合物7)修饰的各种PSP2单半胱氨酸突变体在二价镍离子的存在下的催化性能得到的结果总结。

[0191]

催化剂	浓度 (μM)	距离 (β 碳到发色团) (\AA)	NaHCO_3 (100 mM)	BIH (100 mM)	日光模拟器 ($>400\text{ nm}$)	辐照时 间 (h)	TON
PSP2-147C	40	6.0	+	+	+	12	11
PSP2-151C	40	10.2	+	+	+	12	37
PSP2-66F95C	40	11.9	+	+	+	12	-
PSP2-95C	-	11.9	+	+	+	12	-
(PSP2T1)							
PSP2-95C	40	11.9	-	+	+	12	-
PSP2-95C	40	11.9	+	-	+	12	-
PSP2-95C	40	11.9	+	+	-	12	-
PSP2-95C	40	11.9	+	+	+	6	29
PSP2-95C	40	11.9	+	+	+	12	75
PSP2-95C	40	11.9	+	+	+	24	97
PSP2-95C93Y	40	11.9	+	+	+	24	120
97Y							
(PSP2T2)							
PSP2-155C	40	17.6	+	+	+	12	63
PSP2-26C	40	21.9	+	+	+	12	4

[0192] C表示半胱氨酸,C前面的数字表示突变成半胱氨酸的位点。

[0193]

表 4. 代表性光催化性二氧化碳还原催化剂的比较。考虑规格可变的日光燃料产生，仅在水性溶液中操作不使用贵金属的那些催化剂。

催化剂	[催化剂]	光敏剂	[光敏剂]	产物	TON	TOF(s ⁻¹)	量子产率 (CO)	反应条件
FeTMA	0.001 mM	CuInS ₂ /ZnS	0.03 mM	CO	450	0.004	0.025%	450 nm, 4.5 mW激光笔, 5 mM KCl在 CO ₂ -饱和的水中, TEOA(15 mM), 30h. ⁴⁴
[Co(bpy) ₃] ²⁺	CoCl ₂ 0.17 mM / bpy 17 mM	CdS	8.3 mg/ml	CO+H ₂	44	0.006	n/a	300 W Xe-灯 420 nm, [EMIM][BF ₄]/H ₂ O(4:1 v/v), TEOA(1.5 M), 2 h. ⁴⁵
Ni(terpy) ₂	0.1 mM	CdS	0.001 mM	CO+H ₂	20	0.0001	0.28%	300 W Xe-灯 AM 1.5G >400 nm, 100 mW cm ⁻² , pH6.7, TEOA(0.1 M), 24 h. ²⁷
Ni(terpy) ₂	0.04 mM	PSP2	0.05 mM	CO	120	0.0014	2.6%	300 W Xe-灯 AM 1.5G >400 nm, DMF/H ₂ O(1:1 v/v), BIH(0.1 M), 12 h。这起作用。

[0194] 结论

[0195] 综上所述,通过利用遗传密码子扩展¹⁵,本发明人合理设计了一种有效的光敏蛋白

PSP2,所述蛋白可以视为 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 不含贵金属的蛋白类似物。由于PSP2是遗传编码的,其可以容易地引入到各种生物体中,并且与特定蛋白复合物共同定位。而这是小分子或纳米晶体光敏剂难以实现的。与半导体纳米晶体和小分子光敏剂相比,PSP提供特有的优点,例如,与宽泛的生物系统具有更高的相容性,不依赖贵金属,具有基于突变的可转换的光化学特性,和自组装成精确的三维结构的能力,这能够允许其功能的模块性扩展和准确的机制表征。由此,PSP能够潜在地致敏多种挑战性的化学转化,涉及的领域多样,诸如太阳能转化、光生物学、环境修复和工业生物学等。PSP2T的简单设计抓住了复杂的天然光合作用机制的本质³⁻⁴,为研究蛋白中多种电子/质子转移的机制提供了有价值的模型²⁹,并且通过合理设计和定向进化,为下一代具有显著扩展的能力的光氧还酶奠定了基础。光敏剂,例如最有名的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$,已经引领了合成化学的革命²⁸。利用蛋白超乎寻常的自组装能力³⁰⁻³¹,多样性的酶催化反应,和本发明人快速提高合理设计微型蛋白的能力³²⁻⁴⁰,PSP的设计将为在生物系统中引入新的化学反应创造了多个激动人心的机会。

[0196] 应该理解,尽管参考其示例性的实施方案,已经对本发明进行具体地显示和描述,但是本领域的普通技术人员应该理解,在不背离由后附的权利要求所定义的本发明的精神和范围的前提下,可以在其中进行各种形式和细节的变化,可以进行各种实施方案的任意组合。

[0197] 参考文献:

[0198] 1.Liu,J.et al.Metalloproteins Containing Cytochrome,Iron-sulfur or Copper Redox Centers.Chem.Rev.114,4366-4469 (2014) .

[0199] 2.Marshall,N.M.et al.Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range.Nature 462,113-116 (2009) .

[0200] 3.Blankenship,R.E.et al.Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement.Science 332,805-809 (2011) .

[0201] 4.Romero,E.,Novoderezhkin,V.I.&van Grondelle,R.Quantum design of photosynthesis for bio-inspired solar-energy conversion.Nature 543,355-365 (2017) .

[0202] 5.Appel,A.M.et al.Frontiers,Opportunities,and challenges in biochemical and chemical catalysis of CO_2 fixation.Chem.Rev.,113,6621-6658 (2013) .

[0203] 6.Sakimoto,K.K.,Wong,A.B.&Yang,P.D.Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production.Science 351,74-77 (2016) .

[0204] 7.Liu,C.,Colon,B.C.,Ziesack,M.,Silver,P.A.&Nocera,D.G Water splitting-biosynthetic system with CO_2 reduction efficiencies exceeding photosynthesis.Science 352,1210-1213 (2016) .

[0205] 8.Schuchmann,K.&Muller,V.Direct and reversible hydrogenation of CO_2 to formate by a bacterial carbon dioxide reductase.Science 342,1382-1385 (2013) .

- [0206] 9.Ort,D.R.et al.Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand.Proc.Natl Acad.Sci.112,8529–8536 (2015) .
- [0207] 10.Lewis,N.S.&Nocera,D.G.Powering the planet:Chemical challenges in solar energy utilization.Proc.Natl Acad.Sci.103,15729–15735 (2006) .
- [0208] 11.Gray,H.B.Powering the planet with solar fuel.Nat.Chem.1,7 (2009) .
- [0209] 12.Rao,H.,Chmidt,L.C.S.,Bonin,J.&Robert,M.Visible-light-driven methane formation from CO₂ with a molecular iron catalyst.Nature 548,74–+ (2017) .
- [0210] 13.Giepmans,B.N.G.,Adams,S.R.,Ellisman,M.H.&Tsien,R.Y.The fluorescent toolbox for assessing protein location and function.Science 312,217–224 (2006) .
- [0211] 14.Chattoraj,M.,King,B.A.,Bublitz,G.U.&Boxer,S.G.Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein:Multiple states and proton transfer.Proc. Natl Acad.Sci.93,8362–8367 (1996) .
- [0212] 15.Pearson,A.D.et al.Trapping a transition state in a computationally designed protein bottle.Science 347,863–867 (2015) .
- [0213] 16.Wang,L.,Xie,J.&Schultz,P.G.Expanding the genetic code.Annu.Rev.Biophy. Biomol.35,225–249 (2006) .
- [0214] 17.Breslow,R.et al.Remote oxidation of steroids by photolysis of attached benzophenone groups.J.Am.Chem.Soc.95,3251–3262 (1973) .
- [0215] 18.Breslow,R.,Kitabatake,S.&Rothbard,J.Photoreactions of Charged Benzophenone with Amphiphiles in Micelles and Multicomponent Aggregates as Conformational Probes.J.Am.Chem.Soc.100,8156–8160, (1978) .
- [0216] 19.Braun,A.M.et al.Photochemical Processes of Benzophenone in Microheterogeneous Systems.J.Am.Chem.Soc.103,7312–7316, (1981) .
- [0217] 20.Turro,N.J.,Aikawa,M.&Gould,I.R.The Laser Vs the Lamp—a Novel Laser-Induced Adiabatic Reaction and Luminescence of Benzophenone.J.Am. Chem.Soc.104,856–858, (1982) .
- [0218] 21.Kauer,J.C.,Erickson-Viitanen,S.,Wolfe,H.R.,Jr&DeGrado,W.F. p-Benzoyl-L-phenylalanine,a new photoreactive amino acid.Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide.J.Biol.Chem.261, 10695–10700 (1986) .
- [0219] 22.Connelly,N.G&Geiger,W.E.Chemical redox agents for organometallic chemistry.Chem.Rev.96,877–910 (1996) .
- [0220] 23.Hammes-Schiffer,S.&Stuchebrukhov,A.A.Theory of coupled electron and proton transfer reactions.Chem.Rev.,110,6939–6960 (2010) .
- [0221] 24.Li,H.&Zhang,M.T.Tuning excited-state reactivity by proton-coupled electron transfer.Angew.Chem.Int.Ed.55,13132–13136 (2016) .
- [0222] 25Rebelein,J.G,Stiebritz,M.T.,Lee,C.C.&Hu,Y.Activation and reduction

of carbon dioxide by nitrogenase iron proteins. *Nature chemical biology*.13, 147-149, (2017) .

[0223] 26. Dorman, G. & Prestwich, G. D. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* 33, 5661-5673 (1994) .

[0224] 27. Kuehnel, M. F., Orchard, K. L., Dalle, K. E. & Reisner, E. Selective photocatalytic CO₂ reduction in water through anchoring of a molecular Ni catalyst on CdS nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 7217-7223 (2017) .

[0225] 28. Prier, C. K., Rankic, D. A. & MacMillan, D. W. C. Visible light photoredox catalysis with transition metal complexes: applications in organic synthesis. *Chem. Rev.* 113, 5322-5363 (2013) .

[0226] 29. Shih, C. et al. Tryptophan-accelerated electron flow through proteins. *Science* 320, 1760-1762 (2008) .

[0227] 30. Song, W. J. & Tezcan, F. A. A designed supramolecular protein assembly with in vivo enzymatic activity. *Science* 346, 1525-1528 (2014) .

[0228] 31. Hsia, Y. et al. Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron. *Nature* 540, 136-+ (2016) .

[0229] 32. Kan, S. B. J., Lewis, R. D., Chen, K. & Arnold, F. H. Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science* 354, 1048-1051 (2016) .

[0230] 33. Blomberg, R. et al. Precision is essential for efficient catalysis in an evolved Kemp eliminase. *Nature* 503, 418-+ (2013) .

[0231] 34. Jeschek, M. et al. Directed evolution of artificial metalloenzymes for in vivo metathesis. *Nature* 537, 661-665 (2016) .

[0232] 35. Dydi, P. et al. An artificial metalloenzyme with the kinetics of native enzymes. *Science* 354, 102-106 (2016) .

[0233] 36. Joh, N. H. et al. De novo design of a transmembrane Zn²⁺-transporting four-helix bundle. *Science* 346, 1520-1524 (2014) .

[0234] 37. Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. & Schultz, P. G. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11020-11024 (2002) .

[0235] 38. Young, T. S., Ahmad, I., Yin, J. A. & Schultz, P. G. An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E. coli*. *J. Mol. Bio.* 395, 361-374 (2010) .

[0236] 39. Soltau, S. R. et al. Ru-protein-Co biohybrids designed for solar hydrogen production: understanding electron transfer pathways related to photocatalytic function. *Chem. Sci.* 7, 7068-7078 (2016) .

[0237] 40. Soltau, S. R. et al. Charge Separation Related to Photocatalytic H₂ Production from a Ru-Apoflavodoxin-Ni Biohybrid. *ACS Energy Lett.* 2, 230-237 (2017) .

[0238] 41. Hasegawa, E., Seida, T., Chiba, N., Takahashi, T. & Ikeda, H. Contrastive

photoreduction pathways of benzophenones governed by regiospecific deprotonation of imidazoline radical cations and additive effects. *J. Org. Chem.* 70, 9632–9635 (2005).

[0239] 42. Blankenship, R. E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Second edition. 60–61 (John Wiley and Sons Ltd, United Kingdom, 2014).

[0240] 43. Thoi, V. S., Kornienko, N., Margarit, C. G., Yang, P. & Chang, C. J. Visible-light photoredox catalysis: selective reduction of carbon dioxide to carbon monoxide by a nickel N-heterocyclic carbene–isoquinoline complex. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 14413–14424, (2013).

[0241] 44. Lian, S., Kodaimati, M. S. & Weiss, E. A. Photocatalytically Active Superstructures of Quantum Dots and Iron Porphyrins for Reduction of CO₂ to CO in Water. *ACS nano* 12, 568–575 (2018).

[0242] 45. Lin, J. L., Hou, Y. D., Zheng, Y. & Wang, X. C. Integration of [Co(bpy)₃]²⁺ Electron Mediator with Heterogeneous Photocatalysts for CO₂ Conversion. *Chem-Asian J* 9, 2468–2474 (2014).

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 一种可基因编码的人工光合作用蛋白质及其应用
 <130> IB197444
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222>
 <223> 超折叠黄色荧光蛋白 (sfYFP) 的氨基酸序列
 <400> 1
 Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60
 Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95
 Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val
 100 105 110
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr
 115 120 125
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140
 Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

[0001]

	180	185	190
	Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Thr Val Leu Ser 195	200	205
	Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val 210	215	220
	Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu 225	230	235
	His His His His His His 245		
	<210> 2		
	<211> 246		
	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<221> VARIANT		
	<222>		
	<223> sfYFP-BpA66的氨基酸序列, 其中第66位Tyr突变为 二苯甲酮-丙氨酸 (BpA)		
	<400> 2		
	Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val 1	5	10
[0002]	Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu 20	25	30
	Gly Glu Gly Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys 35	40	45
	Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu 50	55	60
	Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln 65	70	75
	His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg 85	90	95
	Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val 100	105	110
	Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr 115	120	125
	Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn 130	135	140
	Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly 145	150	155
	Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val 165	170	175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Thr Val Leu Ser
 195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu
 225 230 235 240

His His His His His His
 245

<210> 3
 <211> 738

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222>
 <223> sfYFP-BpA66在大肠杆菌中表达的核苷酸序列

[0003]

<400> 3
 atgtccaag gcgaagaact gttcaccgga gtagtgcccta tctcgtcga actggacggt 60
 gatgtgaacg gccacaaatt ctctgtgcgc ggtgagggtg agggcgacgc tacaattggg 120
 aagctgaccc tgaattcat ctgcaccact ggtaaactgc cggtgccgtg gccgacgctg 180
 gttactacgc tgggttaggg tctccagtgt ttcgctcgtc atcctgatca catgaagcag 240
 cagcactttt tcaaatctgc tatgccgaa ggtacgttc aggaacgtac tatctcgttc 300
 aaagatgacg gcaatacaa aaccgagca gttgtcaaat tcgaaggatga cactctggtt 360
 aaccgtattg aactgaaagg tacggatttc aaagaagatg gcaacattct gggtcacaaa 420
 ctggagtaca attcaactc tcacaacgtg tatattactg ccgataaaca gaaaaacggg 480
 atcaaagcga acttcaactg gcgccataac gttgaggatg gtagcgtcca gctcgcagat 540
 cactaccagc agaatacccc gattggtgac ggtccggttc tgctgccgga caaccattat 600
 ctgtctatc agaccgtgct gtctaaagac ccaaatgaaa aacgtgacca catggtgctg 660
 ctggaatttg tcaccgcggc gggcattact ctgggcatgg acgaacttta caaactcgag 720
 caccaccacc accaccac 738

<210> 4
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222>
 <223> sfYFP-BpA66-Phe203 (PSP1) 的氨基酸序列, 其中第66位Tyr
 突变为二苯甲酮-丙氨酸 (BpA)

<400> 4

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

1	5	10	15
Glu Leu Asp	Gly Asp Val Asn Gly	His Lys Phe Ser Val	Arg Gly Glu
	20	25	30
Gly Glu Gly	Asp Ala Thr Ile	Gly Lys Leu Thr Leu	Lys Phe Ile Cys
	35	40	45
Thr Thr Gly	Lys Leu Pro Val	Pro Trp Pro Thr	Leu Val Thr Thr Leu
	50	55	60
Gly Tyr Gly	Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr	Pro Asp His Met Lys	Gln
65	70	75	80
His Asp Phe Phe	Lys Ser Ala Met Pro	Glu Gly Tyr Val	Gln Glu Arg
	85	90	95
Thr Ile Ser	Phe Lys Asp Asp Gly	Lys Tyr Lys Thr Arg	Ala Val Val
	100	105	110
Lys Phe Glu	Gly Asp Thr Leu	Val Asn Arg Ile Glu	Leu Lys Gly Thr
	115	120	125
Asp Phe Lys	Glu Asp Gly Asn Ile Leu	Gly His Lys Leu Glu Tyr	Asn
	130	135	140
Phe Asn Ser	His Asn Val Tyr Ile Thr	Ala Asp Lys Gln Lys Asn	Gly
145	150	155	160
Ile Lys Ala	Asn Phe Thr Val Arg His	Asn Val Glu Asp Gly	Ser Val
	165	170	175
Gln Leu Ala	Asp His Tyr Gln Gln	Asn Thr Pro Ile Gly	Asp Gly Pro
	180	185	190
Val Leu Leu	Pro Asp Asn His Tyr	Leu Ser Phe Gln Thr	Val Leu Ser
	195	200	205
Lys Asp Pro	Asn Glu Lys Arg Asp His Met	Val Leu Leu Glu Phe	Val
	210	215	220
Thr Ala Ala	Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp	Glu Leu Tyr Lys Leu	Glu
225	230	235	240
His His His	His His		
	245		
<210>	5		
<211>	738		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<221>	CDS		
<222>			
<223>	sfYFP-BpA66-Phe203 (PSP1) 在大肠杆菌中表达的核苷酸序列		
<400>	5		
atgtccaag gcaagaact gttcaccgga gtagtccta tctctgtcga actggacggt			60


```

gatgtgaacg gccacaaatt cctgtgctgc ggtgagggtg agggcgacgc tacaattggg 120
aagctgaccc tgaattcat ctgcaccact ggtaaactgc cggtgccgtg gccgacgtg 180
gttactacgc tgggttaggg tctccagtgt ttcgctcgct atcctgatca catgaagcag 240
cagcactttt tcaaactctgc tatgccgaa ggctacgttc aggaacgtac tatctcgttc 300
aaagatgacg gcaatacaaa aaccggagca gttgtcaaat tgaaggatga cacactggtt 360
aaccgtattg aactgaaagg tacggatttc aaagaagatg gcaacattct gggtcacaaa 420
ctggagtaca atttcaactc tcacaactgt tatattactg ccgataaaca gaaaaacggg 480
atcaaagcga acttcaactgt gcgccataac gttgaggatg gtagcgtcca gctcgcagat 540
cactaccage agaatacccc gattgggtgac ggtccggttc tgctgccgga caaccattat 600
ctgtccttcc agaccgtgct gtctaaagac ccaaatgaaa aacgtgacca catggtgctg 660
ctggaatttg tcaccggcgc gggcattact ctgggcatgg acgaacttta caaactcgag 720
caccaccacc accaccac 738
    
```

<210> 6
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222>
 <223> sfYFP-BpA66-Asp203 Glu148 (PSP2) 的氨基酸序列,
 其中第66位Tyr突变为二苯甲酮-丙氨酸 (BpA)

[0005]

<400> 6

```

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1           5           10           15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
                20           25           30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
                35           40           45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
50           55           60

Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
65           70           75           80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
                85           90           95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val
                100          105          110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr
                115          120          125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130          135          140
    
```

Phe Asn Ser Glu Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Asp Gln Thr Val Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 His His His His His His
 245

<210> 7
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CDS
 <222>
 <223> sfYFP-BpA66-Asp203 Glu148 (PSP2) 在大肠杆菌中表达的核苷酸序列

[0006]

<400> 7
 atgtccaaag gegaagaact gttcaccgga gtagtgcceta tctctgtega actggacggt 60
 gatgtgaacg gccacaaatt ctctgtgcgc ggtgagggtg agggcgacgc tacaattggg 120
 aagctgacce tgaattcat ctgcaccact ggtaaactgc cggtgccgtg gccgacgctg 180
 gttactacgc tgggttaggg tctccagtgt ttcgctcgtc atcctgatca catgaagcag 240
 caccactttt tcaaactcgc tatgccgaa ggctacgttc aggaacgtac tatctcgttc 300
 aaagatgacg gcaatacaa aaccgagca gttgtcaaat tcgaagggtga cacactggtt 360
 aaccgtattg aactgaaagg tacggatttc aaagaagatg gcaacattct gggtcacaaa 420
 ctggagtaca attcaactc tgagaacgtg tatattactg cegataaaca gaaaaacggg 480
 atcaaagcga acttcaactg gcgccataac gttgaggatg gtagcgtcca gctcgcagat 540
 cactaccage agaatacccc gattggtgac ggtecggttc tgctgccgga caaccattat 600
 ctgtccgate agaccgtgct gtctaaagac ccaaatgaaa aacgtgacca catggtgctg 660
 ctggaatttg tcaccgcggc gggcattact ctgggcatgg acgaacttta caaactcgag 720
 caccaccacc accaccac 738

<210> 8
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> VARIANT
 <222>

<223> PSP2-95C的氨基酸序列, 其中第66位Tyr突变为
二苯甲酮-丙氨酸 (BpA)

<400> 8

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
50 55 60

Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Cys Arg
85 90 95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val
100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr
115 120 125

[0007]

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130 135 140

Phe Asn Ser Glu Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145 150 155 160

Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val
165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Asp Gln Thr Val Leu Ser
195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu
225 230 235 240

His His His His His His
245

<210> 9

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS
 <222>
 <223> PSP2-95C在大肠杆菌中表达的核苷酸序列

<400> 9
 atgtccaaag gegaagaact gttcaccgga gtagtgcta tectctgaga actggacggt 60
 gatgtgaacg gccacaaatt ctctgtgcgc ggtgagggtg agggcgacgc tacaattggg 120
 aagctgacct tgaattcat ctgcaccact ggtaaactgc cggtgccgtg gccgacgctg 180
 gttactacgc tgggttaggg tctccagtgt ttcgctcgtc atcctgatca catgaagcag 240
 cagcactttt tcaaactcgc tatgccggaa ggctacgttc agtgccgtac tatctcgttc 300
 aaagatgacg gcaatacaa aaccgagca gttgtcaaat tcgaagggtga cacactggtt 360
 aaccgtattg aactgaaagg tacggatttc aaagaagatg gcaacattet gggtcacaaa 420
 ctggagtaca atttcaacte tgagaacgtg tatattactg ccgataaaca gaaaaacggg 480
 atcaaagcga acttcaactg gcgccataac gttgaggatg gtagcgtcca gctcgcagat 540
 cactaccagc agaatacccc gattggtgac ggtccggttc tgcctccgga caaccattat 600
 ctgtccgata agaccgtgct gtctaaagac ccaaatgaaa aacgtgacca catggtgctg 660
 ctggaatttg tcaccgcggc gggcattact ctgggcatgg acgaacttta caaactcgag 720
 caccaccacc accaccac 738

<210> 10
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0008]

<220>
 <221> VARIANT
 <222>
 <223> PSP2-95C93Y97Y的氨基酸序列, 其中第66位Tyr
 突变为二苯甲酮-丙氨酸 (BpA)

<400> 10
 Met Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60
 Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Tyr Gln Cys Arg
 85 90 95
 Tyr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val
 100 105 110
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr

115	120	125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn 130 135 140		
Phe Asn Ser Glu Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly 145 150 155 160		
Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val 165 170 175		
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro 180 185 190		
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Asp Gln Thr Val Leu Ser 195 200 205		
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val 210 215 220		
Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu Glu 225 230 235 240		
His His His His His His 245		

[0009]

<210> 11
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> CDS
 <222>
 <223> PSP2-95C93Y97Y在大肠杆菌中表达的核苷酸序列

<400> 11
 atgtccaaag gegaagaact gttcaccgga gtagtgccta tcctcgtcga actggacggt 60
 gatgtgaacg gccacaatt ctctgtgegc ggtgagggtg agggcgacgc tacaattggg 120
 aagctgacce tgaattcat ctgcaccact ggtaaacgac cggtgccgtg gccgacgctg 180
 gttactacgc tgggttaggg tctccagtgt ttcgctcget atcctgatca catgaagcag 240
 caccactttt tcaaatctgc tatgccggaa ggctactacc agtgccgta catctcgttc 300
 aaagatgacg gcaaatataa aaccgagca gttgtcaaat tcgaaggatga cacactggtt 360
 aaccgtattg aactgaaagg tacggatttc aaagaagatg gcaacattct gggtcacaaa 420
 ctggagtaca atttcaacte tgagaacgtg tatattactg ccgataaaca gaaaaacggg 480
 atcaaacgca acttcaactgt gcgcataaac gttgaggatg gtagegtcca gctcgcagat 540
 cactaccage agaatacccc gattggtgac ggtccggttc tgetgccgga caaccattat 600
 ctgtccgate agaccgtgct gtctaaagac ccaaatgaaa aacgtgacca catggtgctg 660
 ctggaatttg tcaccgcggc gggcattact ctggcatgg acgaacttta caaactcgag 720
 caccaccacc accaccac 738

<210> 12
 <211> 738

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> CDS
 <222>
 <223> sfYFP在大肠杆菌中表达的核苷酸序列

[0010] <400> 12
 atgtccaaag gcgaagaact gttcaccgga gtagtgccta tctctcgtcga actggacggt 60
 gatgtgaacg gccacaaatt ctcgtgtcgc ggtgagggtg agggegcgc tacaattggg 120
 aagctgacce tgaaattcat ctgcaccact ggtaaactgc cggtgccgtg gccgacgctg 180
 gtiactacgc tgggittacgg tctccagtgt ttcgctcgtc atcctgatca catgaagcag 240
 cagcactttt tcaaactctgc tatgccggaa ggctacgttc aggaacgtac tatctcgttc 300
 aaagatgacg gcaaatacaa aacccgagca gttgtcaaat tcgaaggatga cacactggtt 360
 aaccgtattg aactgaaagg tacggatttc aaagaagatg gcaacattct gggtcacaaa 420
 ctggagtaca atttcaactc tcacaacgtg tatattactg cegataaaca gaaaaacggg 480
 atcaaagega acttactgt gcgccataac gttgaggatg gtagegtcca gctcgcagat 540
 caetaccage agaatacccc gattgggtgac ggtccggttc tgctgccgga caaccattat 600
 ctgtcctate agaccgtgtc gtctaaagac ccaaatgaaa aacgtgacca catggtgctg 660
 ctggaatttg tcaccgcgge gggcattact ctgggcatgg acgaacttta caaactcgag 720
 caccaccacc accaccac 738

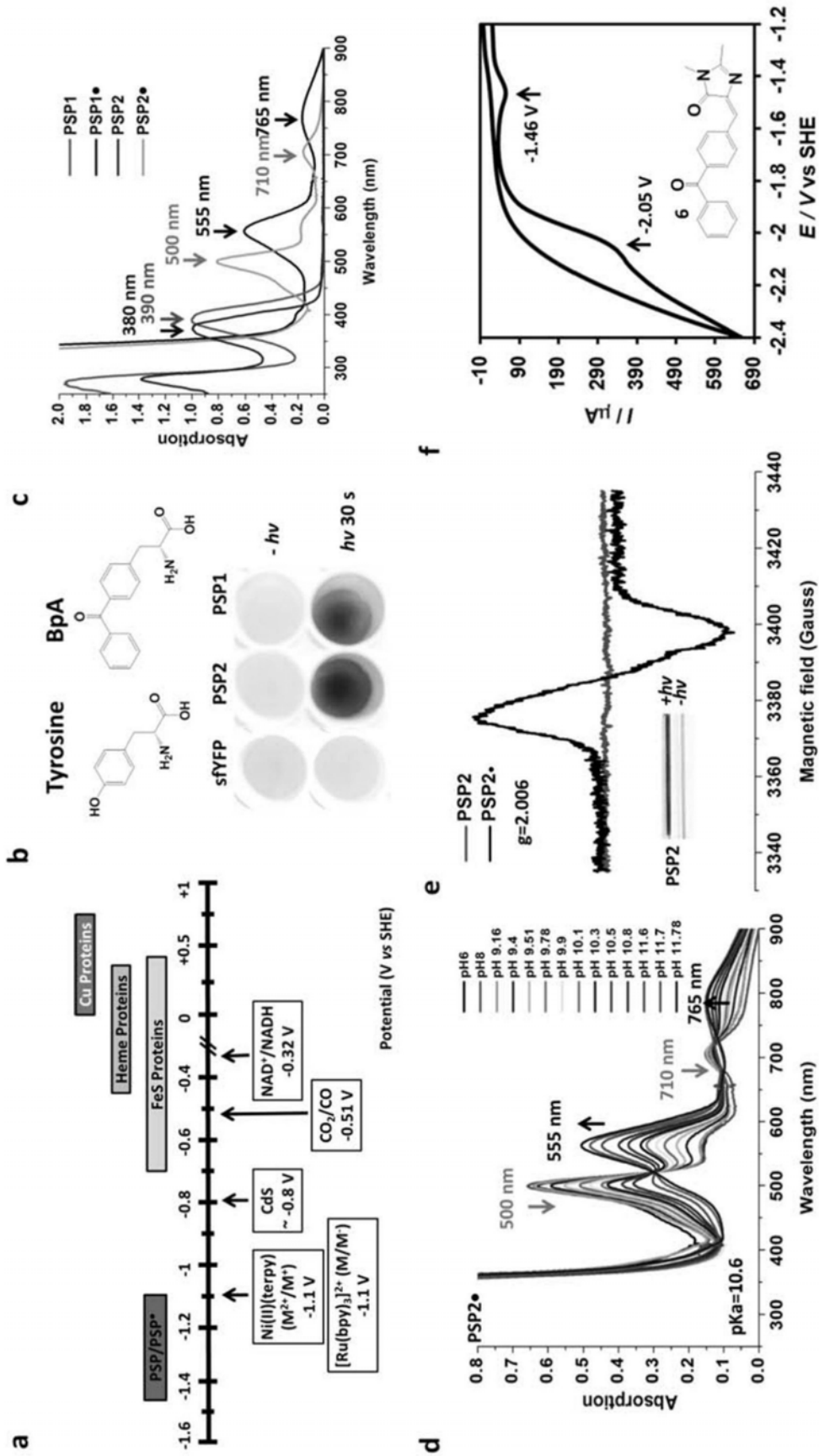


图1

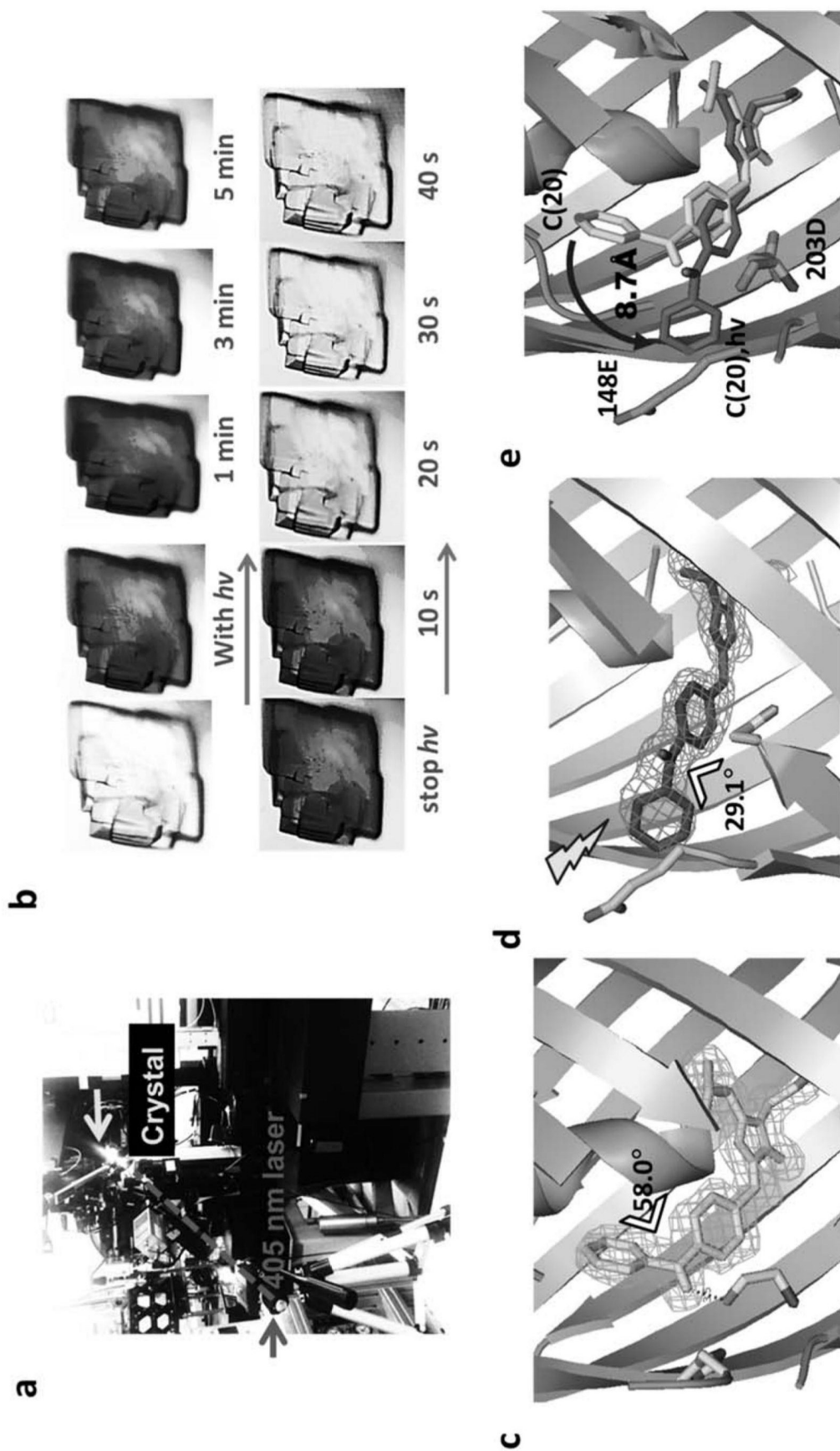


图2

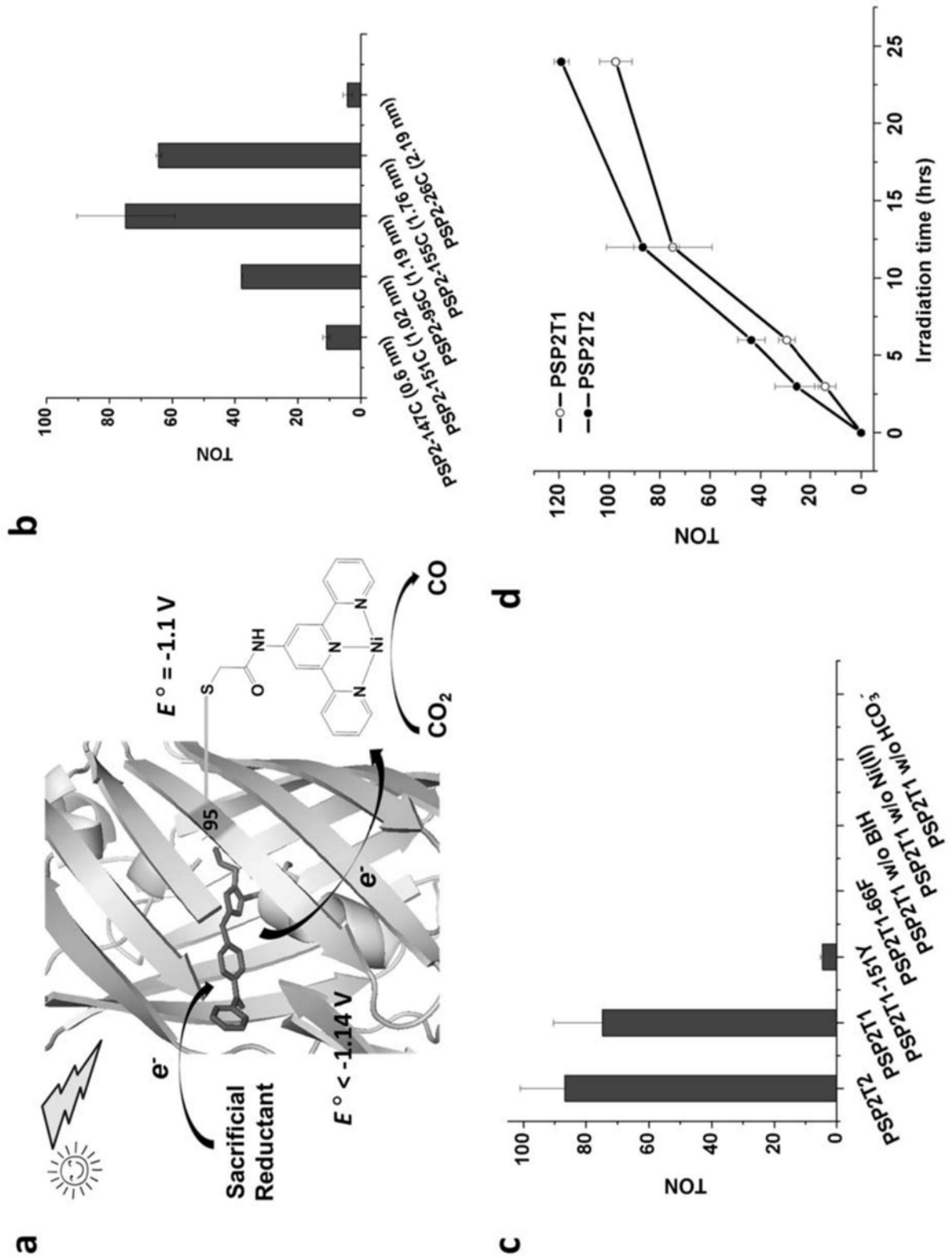


图3

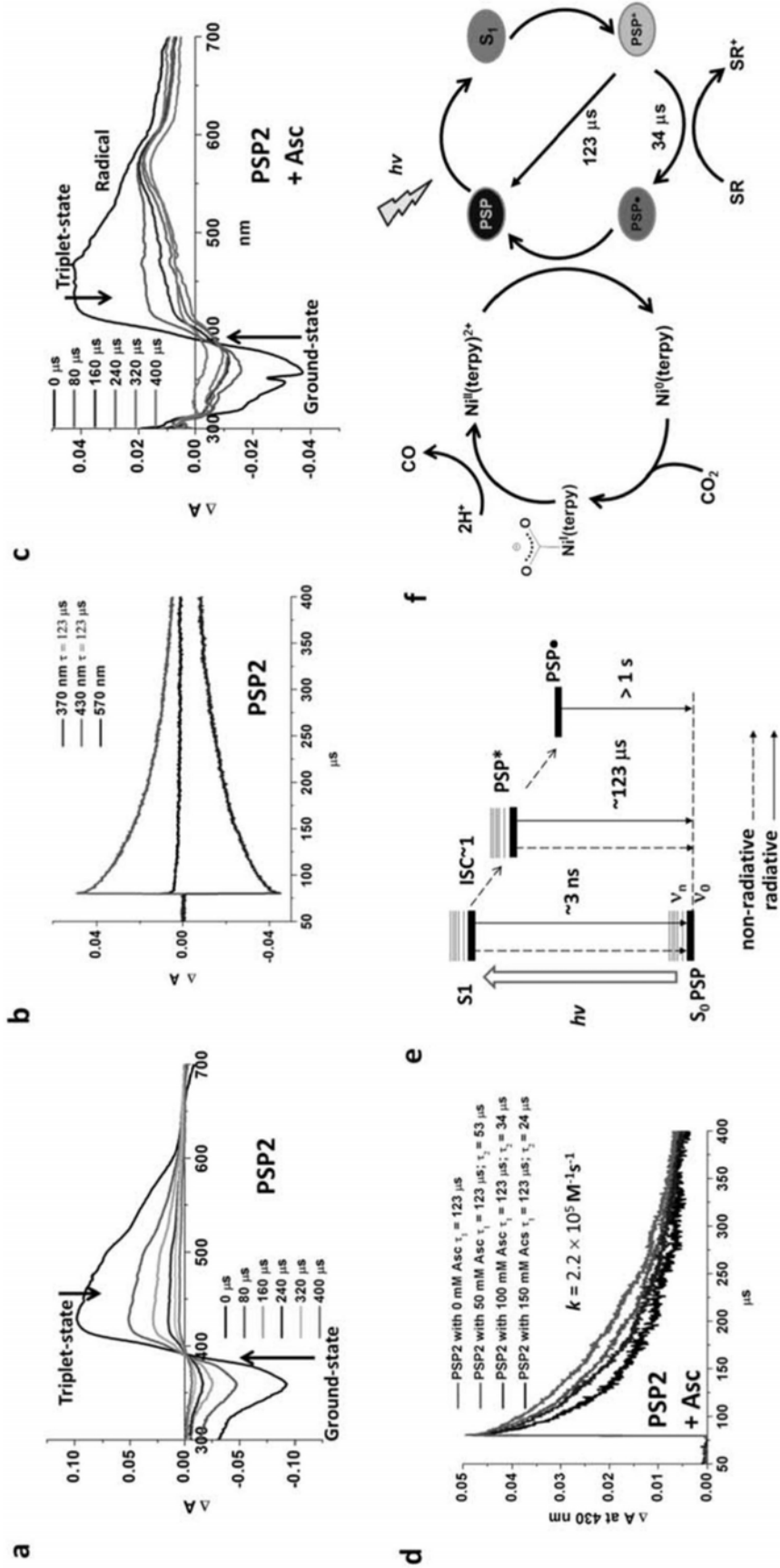


图4

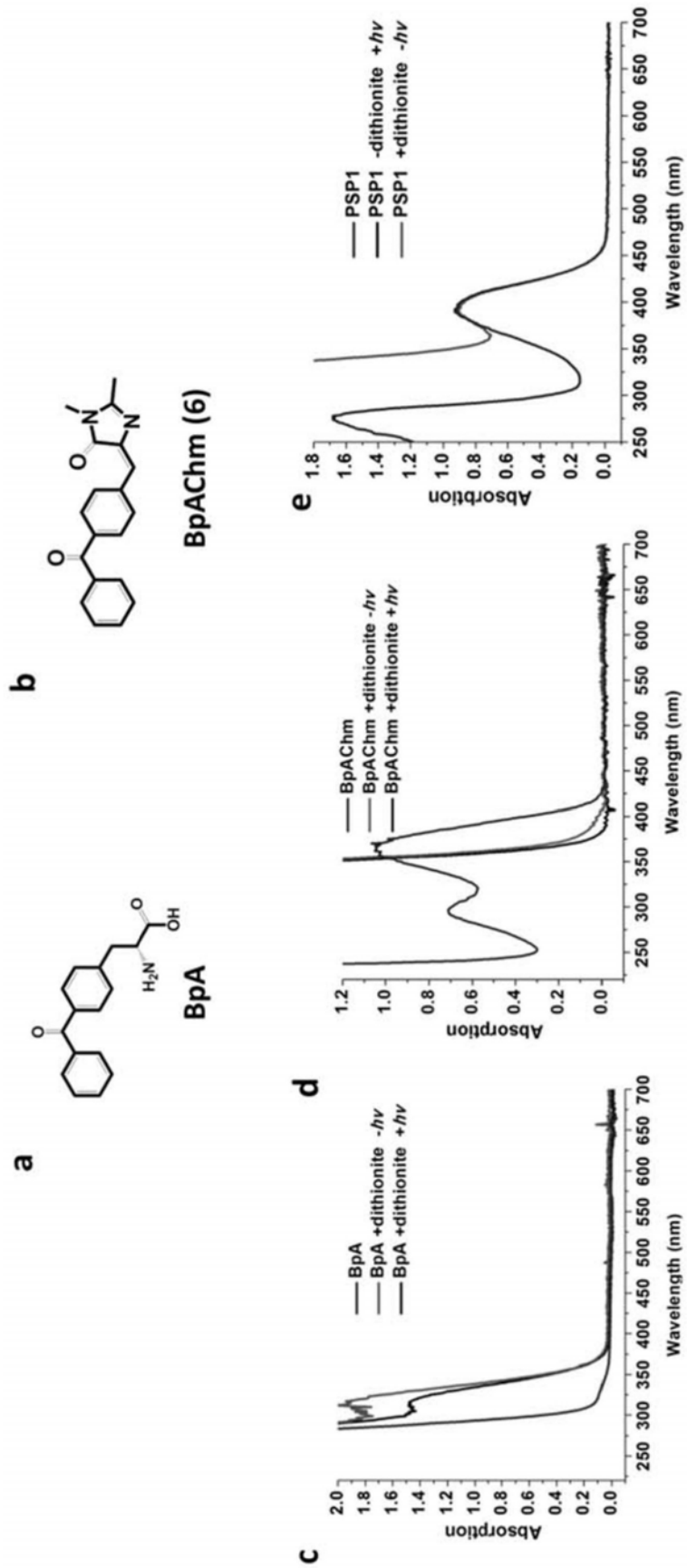


图5

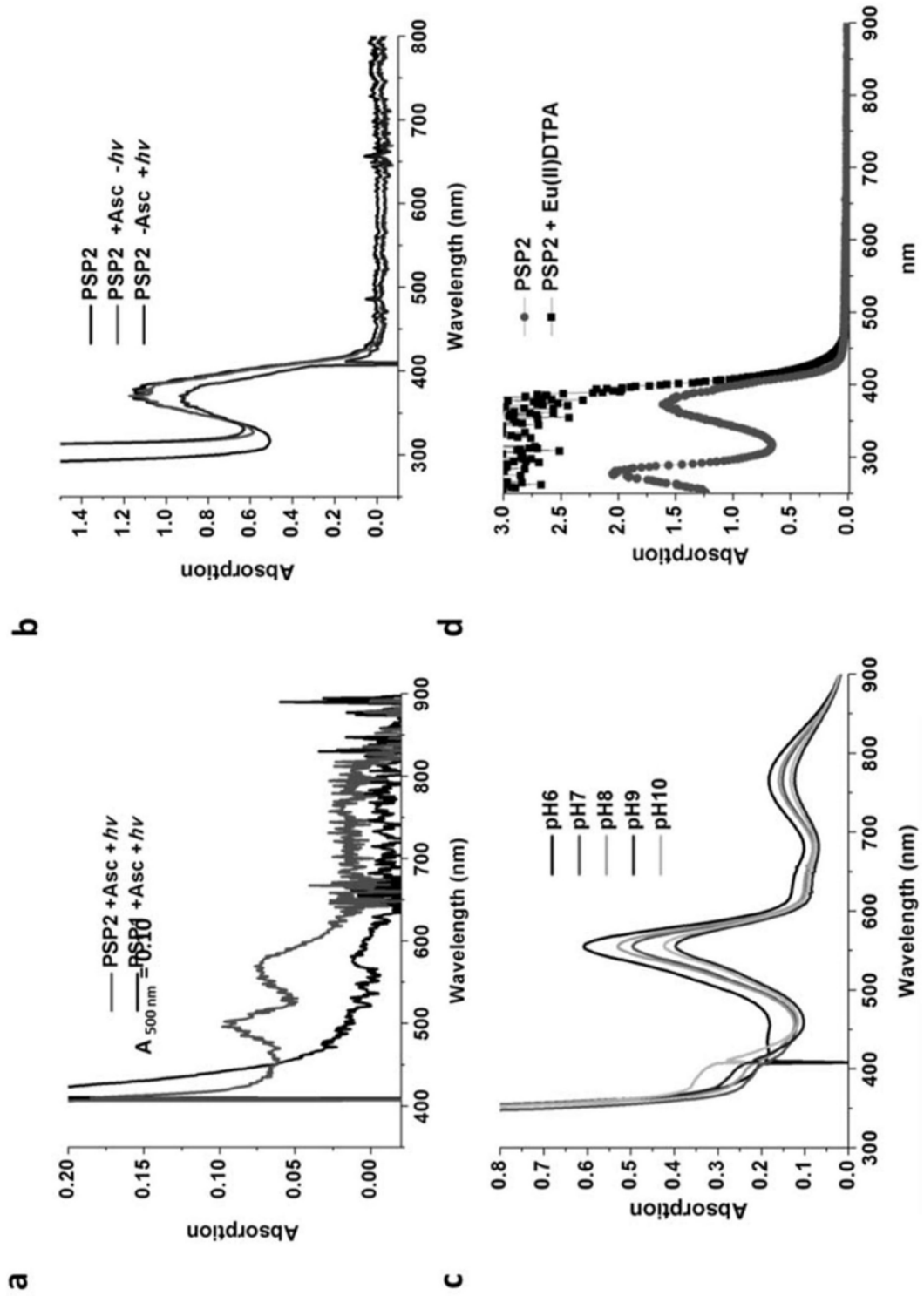


图6

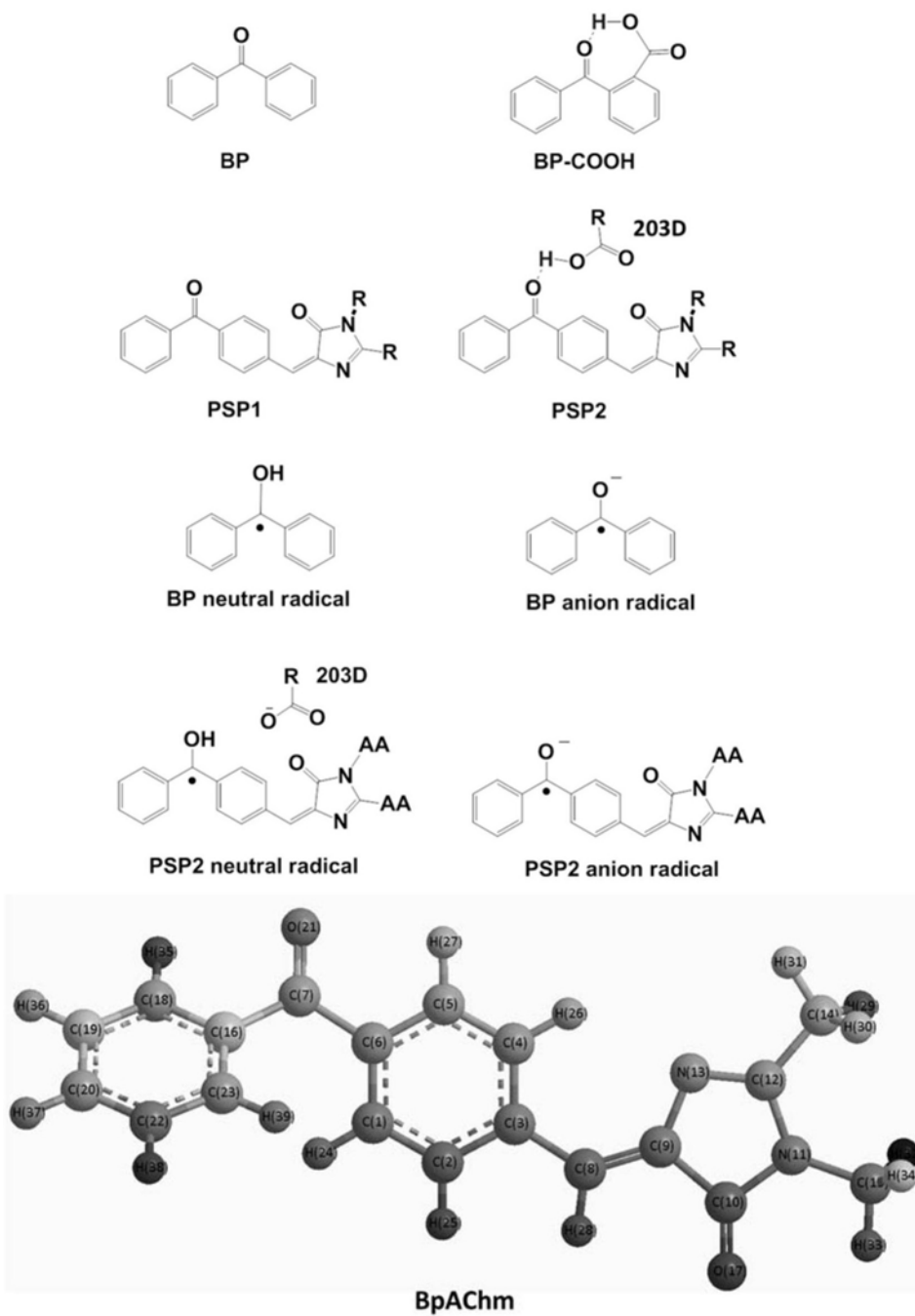


图7

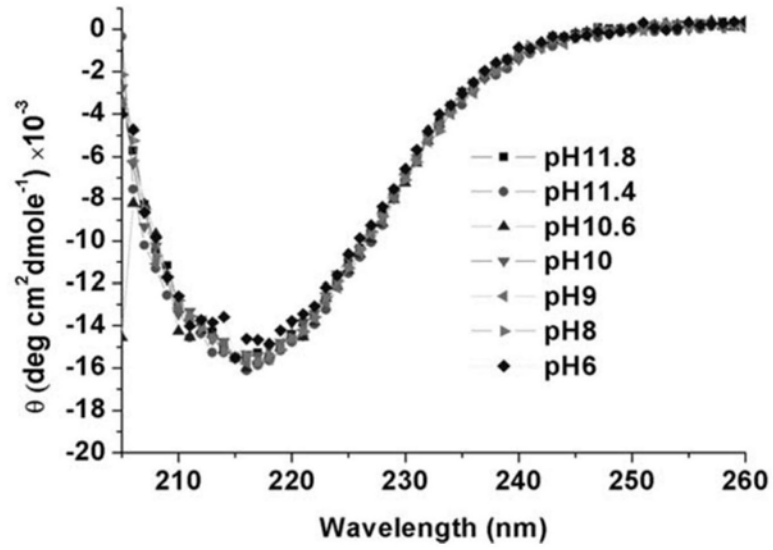


图8

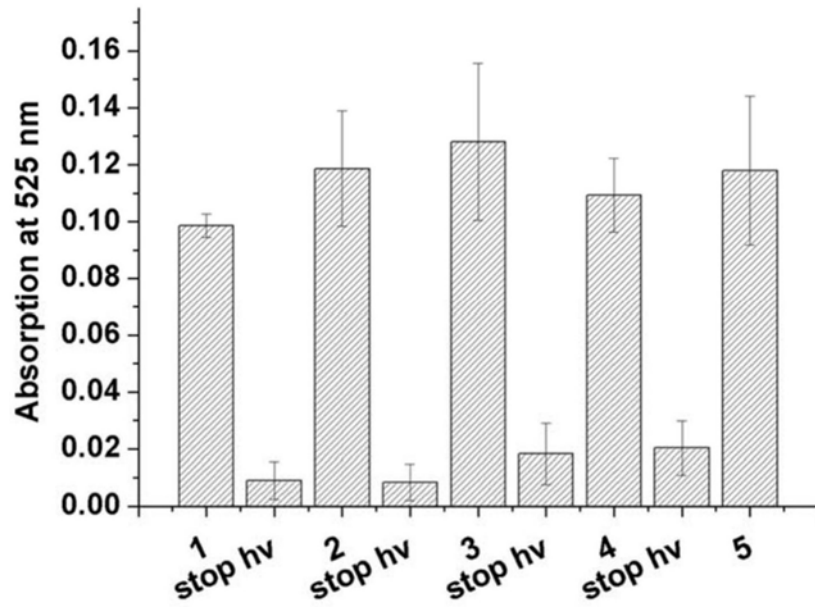


图9

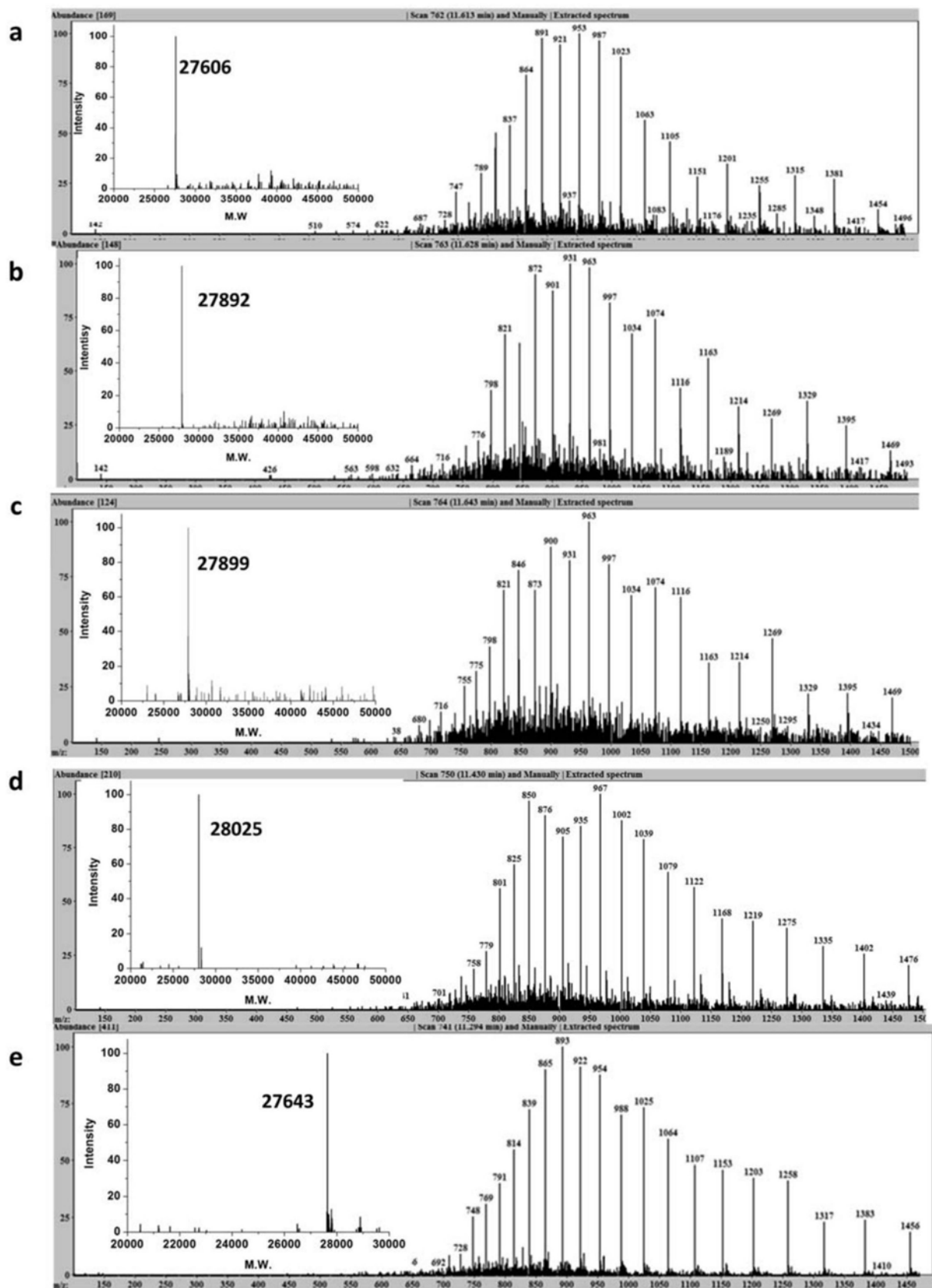


图10

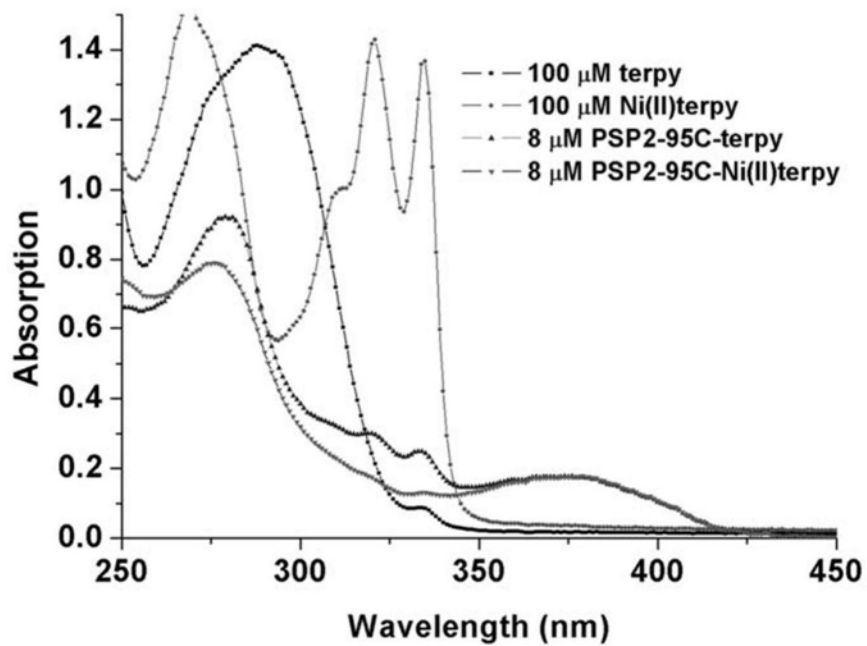


图11

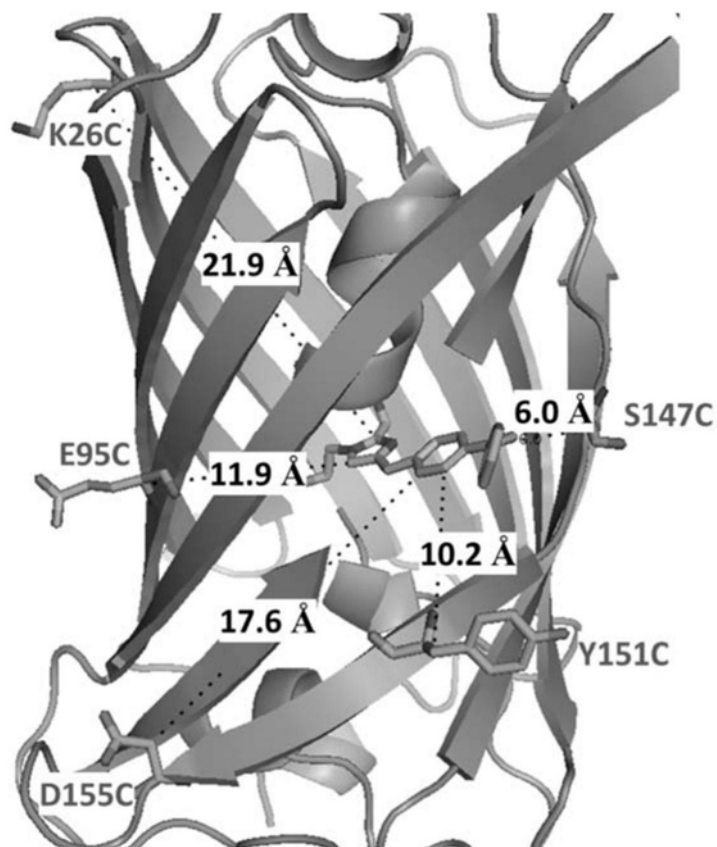
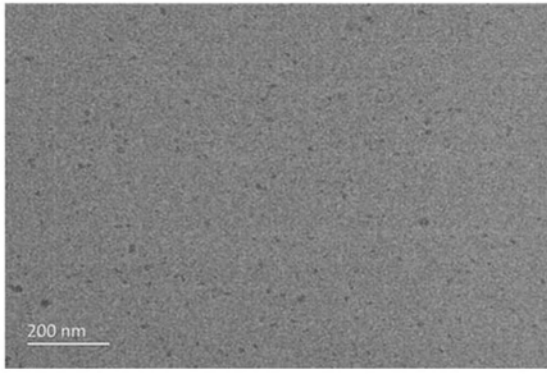


图12

a



b

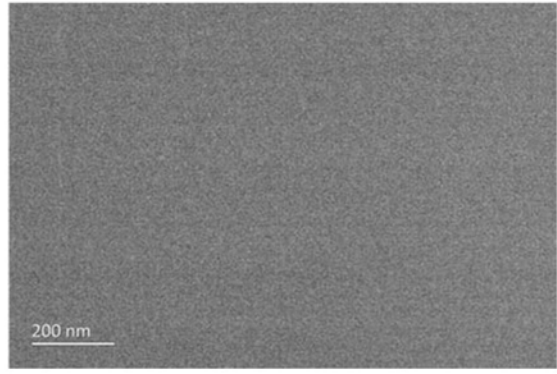


图13

超折叠黄色荧光蛋白 (sfYFP) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1):

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTLLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLG*GLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGKYKTRAVVK
FEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNNSHNVYITADKQKNGIKANFTVRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQTVLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITLGMDELYKLEHHHHHH

sfYFP-BpA66 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2): 其中第 66 位的“*”表示 BpA

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTLLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLG*GLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGKYKTRAVVK
FEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNNSHNVYITADKQKNGIKANFTVRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQTVLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITLGMDELYKLEHHHHHH

sfYFP-BpA66-Phe203 (PSP1) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4): 其中第 66 位的“*”表
示 BpA

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTLLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLG*GLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGKYKTRAVVK
FEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNNSHNVYITADKQKNGIKANFTVRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSFQTVLSKDPNEKRDHMLLEFVTA
AGITLGMDELYKLEHHHHHH

sfYFP-BpA66-Asp203 Glu148 (PSP2) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6): 其中第 66 位
的“*”表示 BpA

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTLLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLG*GLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGKYKTRAVVK
FEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNSENVYITADKQKNGIKANFTVRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSDQTVLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITLGMDELYKLEHHHHHH

PSP2-95C 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8): 其中第 66 位的“*”表示 BpA
MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTLLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLG*GLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQCRTISFKDDGKYKTRAVVK
FEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNSENVIYITADKQKNGIKANFTVRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSDQTVLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITLGMDELYKLEHHHHHH

PSP2-95C93Y97Y 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 10): 其中第 66 位的“*”表示 BpA
MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTLLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLG*GLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYQCRYISFKDDGKYKTRAVVK
FEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEYNFNSENVIYITADKQKNGIKANFTVRHN
VEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSDQTVLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITLGMDELYKLEHHHHHH

图14