

Supplementary Figures

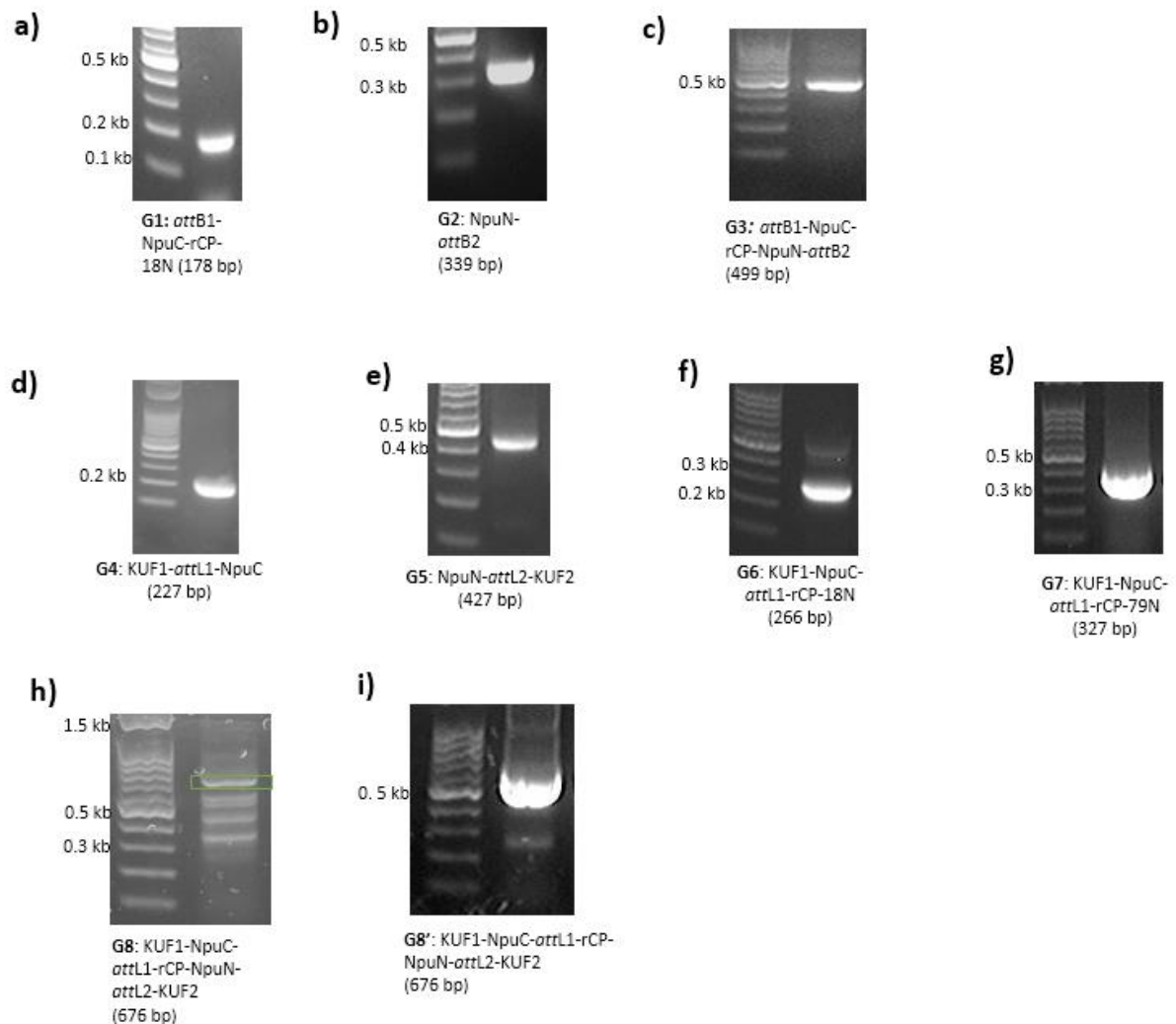


Figure S1. a) Electrophoresis of the PCR product *attB1*-NpuC-rCP-18N (178 bp). b) Electrophoresis of the PCR product NpuN-*attB2* (339 bp). c) Electrophoresis of the PCR product *attB1*-NpuC-rCP-NpuN-*attB2* (499 bp) (178 bp). d) Electrophoresis of the PCR product KUF1-*attL1*-NpuC (227 bp). e) Electrophoresis of the PCR product NpuN-*attL2*-KUF2 (427 bp). f) Electrophoresis of the PCR product KUF1-*attL1*-NpuC-rCP-18N (266 bp). g) Electrophoresis of the PCR product KUF1-*attL1*-NpuC-rCP-79N (327 bp). h) Electrophoresis of the PCR product KUF1-*attL1*-NpuC-rCP-NpuN-*attL2*-KUF2 (676 bp). i) Electrophoresis of the amplified PCR product KUF1-*attL1*-NpuC-rCP-NpuN-*attL2*-KUF2 (676 bp).

1 10 20 30 40 50 60 70 80

CP_1 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_2 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_3 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_4 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_5 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_6 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_7 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_8 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_9 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_10 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_11 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

CP_12 ATGTCGCTACTACCATCACCATCACCATCACCTCGAATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACAC

90 100 110 120 130 140 150 160 170

CP_1 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_2 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_3 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_4 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_5 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_6 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_7 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_8 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_9 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_10 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_11 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

CP_12 GTAAATATTTAGGCAACAAAAATGCTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTGCACTCAAAAAATGGCTTCATAGCTTC

180 190 200 210 220 230 240 250

CP_1 TAATTGGAACAAAGTACCAAGACGCTCTGTTTAAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_2 TAATTGCTGACACGAGAGGGGGGAGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_3 TAATTGACACGGGAACCGGACCCAGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_4 TAATTGGAACAGCACGACCGCTGCACTGTTTAAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_5 TAATTGGAAGCGGGGCTGCTGCGCGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_6 TAATTGCTGATGTCGCGCTTCTGCTGTTTAAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_7 TAATTGACCGCGCGCGACGAGCTCGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_8 TAATTGACCGGTCCGCTCGGGGCGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_9 TAATTGACCGGTGCTGGCGCTGCATGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_10 TAATTGCTCCCGCGCGCACCAACACCTGTTTAAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_11 TAATTGATGATCTTCCACCAGCAGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

CP_12 TAATTGACCGCTGTAGATCACGGGGTGTTTAAGCTATGAAACGGAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACGATTGGTAAA

260 270 280 290 300 310 320 330 340

CP_1 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_2 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_3 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_4 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_5 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_6 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_7 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_8 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_9 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_10 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_11 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

CP_12 ATTGTAGAAAAAGCGCACCGGAATGTACTGTTTACAGCGTTGATAAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCAG

350 360 370 380 390 400 410 420

CP_1 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_2 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_3 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_4 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_5 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_6 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_7 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_8 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_9 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_10 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_11 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

CP_12 ATCGCGGAGAACAAAGAGGTGTTTGGAGTATGTTTGAAGATGGTTTCATTGATTGCGGGCAACAAAAGACCATAAAGTTTATGACTGT

430 440 450 460 470 480 490 500

CP_1 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_2 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_3 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_4 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_5 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_6 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_7 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_8 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_9 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_10 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_11 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

CP_12 TGATGGTCAAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAAATTTGCCGAATTAA

Figure S2. The verification of nucleotide sequences of cloned R-template in pDESTTM17 vectors. The 12 cloned expression vectors of CP_1 to CP_12 are randomly selected from 12 colonies. The protein-coding region of R-template is sequenced, and the nucleotide sequences encoding rCP are confirmed with the NpuC and NpuN elements.

Supplementary Tables

Table S1. Primers used in this study.

Primer	Nucleotide Sequence (5'→3')
Primer for split intein core template	
NpuC_1	5'-GGGGACAAGTTT <i><u>GTACAAAA</u></i> AGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACACGT-3'
NpuC_2 (NpuC_j_18)	5'-CGTTTCATAGCTTAAACASNNNSNNNSNNNSNNNGCA ATTAGAAGCTATGAAGCC-3'
NpuN_1 (NpuN_t)	5'-TGTTTAAGCTATGAAACGGAAATATTGACAG-3'
NpuN_2	5'-GGGGACCACTTT <i><u>GTACAAG</u></i> AAAGCTGGGTCTTAATTCGGCAAATTATCAAC-3'
Primers for cloning to Gateway Destination vector R-template	
KUF_1	5'-GTCTTAAGCTCGGGCCCC-3'
NpuC_t	5'-ATTAGAAGCTATGAAGCC-3'
KUF_2	5'-GGATATCAGCTGGATGGC-3'
NpuC_j_79	5'- CGATGCGCTTTTCTACAATTTTACCAATCGGTAATAATCCATATTCTACTGTCAATATTTTC CGTTTCATAGCTTAAACA-3'

The *att* sequences are shown in italic. The random cyclic peptide sequences are shown in bold. The underlined and italic bases indicate the 7-bp asymmetric overlap of att site.

Table S2. PCR fragments for *Npu*_CX₆ SICLOPPS libraries.

Fragment	DNA sequence (5'→3')	Size	Figure
<i>attB1</i> -NpuC-rCP-18N	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGATCAAAATAGCCACACGTAAATATTTAGGCCAAACAAAATGTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATA ATTTTGCACCTCAAAAATGGCTTCATAGCTTCTAATTGCNNSNNSNNSNNSNNSNSTGTTTAAGCTATGAAACG -3'	178	G1
NpuN- <i>attB2</i>	5'- TGTTTAAAGCTATGAAACGGAAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACCGATTGGTAAAATTGTAGAAAAGCG CATCGAATGTACTGTTTATTGCGTTGATAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCACGATCG CGGAGAACAAGAGGTGTTTGAGTATTGTTTGGAAGATGGTTCATTGATTTCGGGCAACAAAAGACCATAAGTTT ATGACTGTTGATGGTCAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAA TTTGCCGAATTAAGACCCAGCTTTCTTGTAACAAGTGGTCCCC-3'	339	G2
<i>attB1</i> -NpuC-rCP- NpuN- <i>attB2</i>	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACACGTAAATATTTAGGCCAAACAAAATGT CTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTTGCACCTCAAAAATGGCTTCATAGCTTCTAATTGCNNSNNSN NSNNSNNSNNSNSTGTTTAAAGCTATGAAACGGAAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACCGATTGGTAAAATTG TAGAAAAGCGCATCGAATGTACTGTTTATTGCGTTGATAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAAT GGCACGATCGCGGAGAACAAGAGGTGTTTGAGTATTGTTTGGAAGATGGTTCATTGATTTCGGGCAACAAAAG ACCATAAGTTTATGACTGTTGATGGTCAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGC GGGTTGATAATTTGCCGAATTAAGACCCAGCTTTCTTGTAACAAGTGGTCCCC-3'	499	G3
(KUF1)- <i>attL1</i> -NpuC	5'- GTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAAT GCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACACGTAAATATTTAGGCCAA CAAAATGTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTTGCACCTCAAAAATGGCTTCATAGCTTCTAAT-3'	227	G4

Table S2 continued. *Npu_CX₆* SICLOPPS libraries PCR fragments.

Fragment	DNA sequence (5'→3')	Size	Figure
(KUF1)- <i>att</i> L1-NpuC-rCP-18N	5'- GTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGA CTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAAT GCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACACGTAAATATTTAGGCAAA CAAAATGTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTTGC ACTCAAAAATGGCTTCATAGCTTCTAATTG CNNSNNSNNSNNSNNSNNSNSTGTTTAAGCTATGAAACG-3'	266	G6
(KUF1)- <i>att</i> L1-NpuC-rCP-79N	5'- GTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTGA CTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAAT GCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACACGTAAATATTTAGGCAAA CAAAATGTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTTGC ACTCAAAAATGGCTTCATAGCTTCTAATTG CNNSNNSNNSNNSNNSNNSNSTGTTTAAGCT ATGAAACGGA AATATTGACA GTAGAATATG GATTATTACC GATTGGTAAAATTGTAGAAA AGCGCATCG-3'	327	G7
NpuN- <i>att</i> L2-(KUF2)	5'- TGTTTAAAGCTATGAAACGGAAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACCGATTGGTAAAATTGTAGAAAAGCG CATCGAATGTACTGTTTATAGCGTTGATAATAATGGAAATATTTATACACAACCTGTAGCACAATGGCACGATCG CGGAGAACAAGAGGTGTTTGAGTATTGTTTGGAAGATGGTTCATTGATTTCGGGCAACAAAAGACCATAAGTTT ATGACTGTTGATGGTCAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGGATTGATGCGGGTTGATAA TTTGCCGAATTAAGACCCAGCTTTCTTGTA CAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAA CAGGTC ACTATCAGTCAAAATAAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCC-3'	427	G5

Table S2 continued. *Npu_CX₆* SICLOPPS libraries PCR fragments.

Fragment	DNA sequence	Size	Figure
Full length (KUF1)- <i>att</i> L1-NpuC- rCP-NpuN- <i>att</i> L2- (KUF2)	5'- GTCTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAAT GCTTTTTTATAATGCCAACTTT <u>G</u> TACAAAAAGCAGGCTTCATGATCAAAATAGCCACACGTAAATATTTAGGCAAA CAAAATGTCTATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTTGCACCTCAAAAATGGCTTCATAGCTTCTAATT G CNNSNNSNNSNNSNNSNNS STGTTTAAGCTATGAAACGGAAATATTGACAGTAGAATATGGATTATTACCGATTG GTAAAATTGTAGAAAAGCGCATCGAATGTACTGTTTATAGCGTTGATAATAATGGAAATATTTATACACAACCTG TAGCACAATGGCACGATCGCGGAGAACAAGAGGTGTTTGAGTATTGTTTGGAAGATGGTTCATTGATTCGGGC AACAAAAGACCATAAGTTTATGACTGTTGATGGTCAAATGTTGCCAATTGATGAAATATTTGAACGTGAATTGG ATTTGATGCGGGTTGATAATTTGCCGAATTAAGACCCAGCTTT <u>C</u> TTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGC TTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCC-3'	676	G8

The *att* sequences of the Gateway vectors are shown in italics.

The random cyclic peptide sequences are shown in bold.

The underlined and italic bases indicate the 7-bp asymmetric overlap of att site.