Supplementary Information for

Programmable Protein Reference Standards for benchmarking sub-10 nm Fluorescence Microscopy

Made Budiarta[1†], Dominic Helmerich[2†], Marcel Streit[1], Marvin Jungblut[1], Sören Doose[2], Philip Kollmannsberger[2], Markus Sauer[1,2*], and Gerti Beliu[1,3*]

[1]Rudolf Virchow Center, Research Center for Integrative and Translational Bioimaging, University of Würzburg, Würzburg, Germany. [2]Department of Biotechnology and Biophysics, Biocenter, University of Würzburg, Würzburg, Germany. [3]Regensburg Center for Ultrafast Nanoscopy, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Regensburg, Germany

*Correspondence: m.sauer@uni-wuerzburg.de, gerti.beliu@ur.de

Table S1. Characteristics of different variants of recombinant wild-type cTRPs

cTRP variants	Amino acid sequences*	ε_{280} (M^{-1} cm^{-1})	MW (g/mol)
1	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGW	5500	84125.77
2	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGW	11250[a] 5500[b]	86774.74[a] 43389.37[b]
3	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHVL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLVAAHLLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSIEILELLRAAHELGGW	16875[a] 5500[b]	89030.79[a] 29678.93[b]
4	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGW*	22500[a] 5500[b]	92000.52[a] 23002.13[b]

His6X tag (green), thrombin cleavage-site (cyan), and cysteine residues responsible for disulfide-linked ring closure (yellow) are highlighted with different colors. Molecular weights and extinction coefficients at 280 nm are indicated as follows: [a] for the fully assembled ring, and [b] for a single subunit (monomer).

Table S2. Characteristics of different variants of recombinant clickable cTRPs

cTRP variants	Amino acid sequences*	ε_{280} (M^{-1} cm^{-1})	MW (g/mol)
cTRP-1	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGWGGSGGLEVLFQGPWSHPQFEK	24960	86835.73
cTRP-2	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXT GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXT GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGWGGSGGLEVLFQGPWSHPQFEK	38645	87632.56
cTRP-3	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGWGGSGGLEVLFQGPWSHPQFEK	52205	88247.17
cTRP-4	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXT GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXT GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXT GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGWGGSGGLEVLFQGPWSHPQFEK	65765	88861.78

cTRP-6	MASSHHHHHHSSGLVPRGSSMGLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSNXTGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGGWGGSGGLEVLFQGPWSHPQFEK	92885	90091.01

*All cTRP PicoRulers were expressed with clickable ncAA ethyl tetrazine (X = Tet2Et or pAzF). Functional elements are color-coded as follows: His6X tag (green), thrombin cleavage site (cyan), disulfide-forming cysteine residues (yellow), ethyl tetrazine (teal), HRV-3C protease cleavage site (gray), and Strep-tag II (magenta).

Table S3. Amino acid sequences of genetically encoded clickable membrane-displayed cTRPs

cTRP variants	Amino acid sequences*
cTRP-1	MRAWIFFLLCLAGRALAAPLAGTHHHHHHGSGDYKDDDDKGSGLVPRGSSM GLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GGWTGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGSLEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGS QLENGGISLLVQNTSWMLLLLLSLSLLQALDFISL
cTRP-2	MRAWIFFLLCLAGRALAAPLAGTHHHHHHGSGDYKDDDDKGSGLVPRGSSM GLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GGWTGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGSLEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGS QLENGGISLLVQNTSWMLLLLLSLSLLQALDFISL
cTRP-2B	MRAWIFFLLCLAGRALAAPLAGTHHHHHHGSGDYKDDDDKGSGLVPRGSSM GLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GGWTGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGSLEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGS QLENGGISLLVQNTSWMLLLLLSLSLLQALDFISL
cTRP-3	MRAWIFFLLCLAGRALAAPLAGTHHHHHHGSGDYKDDDDKGSGLVPRGSSM GLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GGWTGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGSLEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGS QLENGGISLLVQNTSWMLLLLLSLSLLQALDFISL

cTRP-3B	MRAWIFFLLCLAGRALAAPLAGTHHHHHHGSGDYKDDDDKGSGLVPRGSSM GLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GGWTGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGSLEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGS QLENGGISLLVQNTSWMLLLLLSLSLLQALDFISL
cTRP-4	MRAWIFFLLCLAGRALAAPLAGTHHHHHHGSGDYKDDDDKGSGLVPRGSSM GLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXLGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GGWTGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGSLEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGS QLENGGISLLVQNTSWMLLLLLSLSLLQALDFISL
cTRP-6	MRAWIFFLLCLAGRALAAPLAGTHHHHHHGSGDYKDDDDKGSGLVPRGSSM GLDCEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGSGXL GLDPEAIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHELGLDPECIKAAAELGKAGISSEEILELLRAAHEL GGWTGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGSLEVLFQGPGGGGSGGGGSGGGGS QLENGGISLLVQNTSWMLLLLLSLSLLQALDFISL

*All cTRP PicoRulers were expressed with clickable ncAA trans-cyclooctene (X = TCO*A). Functional elements are color-coded as follows: Signaling peptide (olive green), His6X tag (green), FLAG tag (magenta), thrombin cleavage site (cyan), disulfide-forming cysteine residues (yellow), trans-cyclooctene (teal), rigid helix linker (EAAAK)$_6$ (dark green), HRV-3C protease cleavage site (gray), flexible linker (G$_4$S)$_3$ (red) and GPI (dark blue).