



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108642076 A

(43)申请公布日 2018.10.12

(21)申请号 201810247324.3

(22)申请日 2018.03.23

(66)本国优先权数据

201710176691.4 2017.03.23 CN

(71)申请人 康码(上海)生物科技有限公司

地址 201321 上海市浦东新区芙蓉花路500
弄8号楼3楼

(72)发明人 郭敏 章小铃 王海鹏 王静

徐开 陈秋锦 于雪

(51)Int.Cl.

C12N 15/81(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12P 21/00(2006.01)

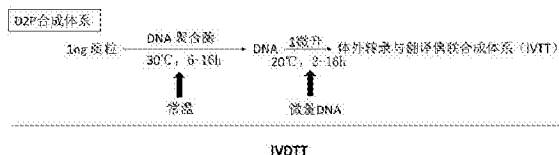
权利要求书2页 说明书24页 附图8页

(54)发明名称

一种体外DNA-to-Protein(D2P)的合成体系、制剂、试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种将DNA复制、转录、翻译偶联的无细胞蛋白质合成的理论设计和技术体系、制剂、试剂盒及其制备方法。具体地,本发明提供的体外无细胞合成系统不仅可以合成复杂蛋白,更可以合成DNA,mRNA,并以此利用极少量的(纳克-微克)DNA模板完成高效、高通量、极便捷的蛋白质合成。



1. 一种将DNA复制、转录、翻译偶联的无细胞合成体系,其特征在于,所述无细胞的合成体系包括:

- (a) DNA聚合酶;
- (b) 解旋酶;
- (c) DNA结合蛋白;
- (d) 用于合成DNA的底物;
- (e) RNA聚合酶;
- (f) 用于合成RNA的底物;
- (g) 用于合成蛋白的底物;
- (h) 酵母细胞提取物。

2. 如权利要求1所述的生物合成体系,其特征在于,所述无细胞的合成体系还包括选自下组的一种或多种组分:

- (j1) 镁离子;
- (j2) 钙离子;
- (j3) 缓冲剂;
- (j4) 能量再生系统;
- (j5) 聚乙二醇;
- (j6) 任选的外源蔗糖;和
- (j7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

3. 如权利要求1所述的合成体系,其特征在于,所述的DNA聚合酶选自下组:phi29 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、Bst DNA聚合酶、*E. coli* DNA聚合酶、DNA聚合酶I的Klenow片段、或其组合。

4. 如权利要求1所述的合成体系,其特征在于,所述的解旋酶选自下组:T7噬菌体复制系统的解旋酶(4B)、UvrD解旋酶、或其组合。

5. 如权利要求1所述的合成体系,其特征在于,所述的DNA结合蛋白选自下组:T4噬菌体基因32蛋白、RB49噬菌体基因32蛋白、T7噬菌体复制系统的单链结合蛋白,DNA结合蛋白7、或其组合。

6. 如权利要求1所述的合成体系,其特征在于,所述的DNA聚合酶,解旋酶及DNA结合蛋白包含DNA聚合酶的保真性,延伸速度,延伸能力等特性的分子改造,多种蛋白或者结构域的融合体,及根据应用于体外合成体系的需要所做出的改造或者多种组合。

7. 一种体外偶联合成DNA, mRNA和蛋白质的方法,其特征在于,包括步骤:

(i) 提供一体外DNA复制体系,包括DNA聚合酶、外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子、解旋酶、DNA结合蛋白、用于合成DNA的底物;

(ii) 在适合的条件,孵育步骤(i)经过T1,再与一转录与翻译偶联的无细胞合成体系结合,从而合成由所述外源DNA编码的DNA, mRNA和蛋白质;或

(iii) 在适合的条件,将所述DNA复制体系、转录体系、翻译体系直接混合,加入外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子,经孵育后合成由外源DNA直接编码的蛋白质。

8. 一种用于体外无细胞生物合成的试剂盒,其特征在于,包括:

- (k1) 第一容器,以及位于第一容器内的细胞提取物;

- (k2) 第二容器,以及位于第二容器内的DNA聚合酶、解旋酶、DNA结合蛋白;
- (kt) 标签或说明书。

9. 如权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,还包括任选的选自下组的一个或多个容器:

- (k3) 第三容器,以及位于第三容器的用于合成DNA的底物;
- (k4) 第四容器,以及位于第四容器的用于合成RNA的底物;
- (k5) 第五容器,以及位于第五容器的用于合成蛋白的底物;
- (k6) 第六容器,以及位于第六容器的镁离子;
- (k7) 第七容器,以及位于第七容器的钾离子;
- (k8) 第八容器,以及位于第八容器的缓冲剂;
- (k9) 第九容器,以及位于第九容器的聚乙二醇和蔗糖等。

10. 一种无细胞合成体系,其特征在于,所述的合成体系将DNA复制、RNA转录和蛋白翻译偶联或整合在一个合成体系中。

11. 一种体外无细胞合成蛋白的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 提供一混合体系,包括权利要求10所述的无细胞合成体系和外源的用于指导蛋白质合成的模板DNA,所述无细胞合成体系包括DNA复制体系和转录、翻译偶联的无细胞合成体系,在适合的条件,孵育所述的DNA复制体系一段时间T1,将转录、翻译偶联的无细胞合成体系与该DNA复制体系结合,经孵育后合成由所述外源DNA编码的蛋白质。

12. 一种体外无细胞合成蛋白的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 提供一权利要求10所述的无细胞合成体系和用于指导蛋白质合成的模板DNA,在适合条件下,孵育所述的无细胞合成体系和用于指导蛋白质合成的模板DNA 一段时间T1,从而合成由所述模板DNA编码的蛋白质。

13. 一种用于体外无细胞合成的制剂,其特征在于,包括:

- (i) 权利要求10所述的无细胞合成体系;和
- (ii) 用于无细胞合成的辅助试剂。

14. 一种用于体外无细胞合成的试剂盒,其特征在于,包括:

- (k1) 第一容器,以及位于第一容器内的权利要求10所述的无细胞合成体系;和
- (kt) 标签或说明书。

一种体外DNA-to-Protein (D2P) 的合成体系、制剂、试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,涉及一种体外DNA-to-Protein (D2P) 的合成体系、制剂、试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 传统的生物合成系统是指通过模式生物细菌、真菌、植物细胞或动物细胞等表达外源基因的一种分子生物学技术。随着科学技术的发展,无细胞表达体系,也称为体外蛋白合成系统,应运而生。体外蛋白合成系统是指以外源目的mRNA或DNA为模板,通过人工控制补加蛋白质合成所需的底物和转录、翻译相关蛋白因子等物质,能实现目的蛋白质的合成。体外蛋白合成系统表达蛋白质无需进行质粒构建、转化、细胞培养、细胞收集和破碎步骤,是一种相对快速、省时、便捷的蛋白质表达方式。

[0003] 商业上的体外合成系统有两种:一种以预先体外转录获得的mRNA作为模板翻译合成蛋白质,另一种是将体外转录与体外翻译同时进行,以DNA为模板合成mRNA然后合成蛋白质。这两种系统都比较复杂且实验要求较高,需要使用者预先进行体外转录实验以获得足够多的mRNA模板,或者需要预先提供大量的DNA或者高浓度的质粒作为模板(模板的质量甚至大于合成蛋白质的质量)。这些弊端增加了使用者的操作时间、制造成本、及实验复杂性,同时也大大限制了生物合成的效率和产量。因此,开发一种更简单、方便、高效率、高产量、低成本的体外生物合成系统已成为基础生物研究领域的迫切需要。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种同时在体外进行DNA, RNA, 蛋白质生物合成的理论模型和设计。

[0005] 本发明提供了一种简单、方便、高效率、高产量、低成本的体外合成系统。

[0006] 本发明提供一种以DNA模板进行体外合成DNA, RNA, 蛋白质方法的建立。

[0007] 本发明提供一种以微量DNA模板进行体外合成蛋白质方法的建立及优化,以克服现有技术所存在的缺陷与不足。

[0008] 本发明的第一个目的是偶联DNA复制,转录及翻译的体外合成系统的理论构建;本发明的第二个目的是偶联DNA复制,转录及翻译的体外合成系统的建立及优化;本发明的第三个目的是提供一种简单可行的偶联DNA-to-Protein (D2P) 的体外生物合成制剂。本发明的第四个目的是提供一种简单、高产量的体外蛋白质合成试剂盒。

[0009] 本发明第一方面提供了一种体外的无细胞的合成体系理论的建立,所述无细胞的合成体系包括:

- (p1) 体内外源DNA合成体系;
- (p2) 合成的DNA-to-mRNA 合成体系;
- (p3) 合成的mRNA-to-Protein 合成体系;

- (p4) 关联 p1-p2-p3 的DNA 序列设计,酶的设计;
- (p5) 实现体外无细胞 DNA-to-Protein (D2P) 合成的系统性理论和定量评估;
- (p6) D2P 体系实现高效蛋白质合成的理论模型建立。

[0010] 本发明第二方面提供了一种偶联DNA复制,转录及翻译的体外合成系统,所述无细胞的合成体系包括:

- (a) DNA聚合酶;
- (b) 解旋酶;
- (c) DNA结合蛋白;
- (d) 用于合成DNA的底物;
- (e) RNA聚合酶;
- (f) 用于合成RNA的底物;
- (g) 用于合成蛋白的底物;
- (h) 细胞提取物;

在另一优选例中,所述无细胞的蛋白合成体系还包括选自下组的组分:

- (j1) 镁离子;
- (j2) 钙离子;
- (j2) 缓冲剂;
- (j3) 能量再生系统;
- (j4) 聚乙二醇;
- (j5) 任选的外源蔗糖;
- (j6) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0011] 在另一优选例中,所述的DNA聚合酶包括:phi29 DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、Bst DNA 聚合酶、*Ecoli* DNA 聚合酶、DNA聚合酶I的Klenow片段等用于恒温扩增的聚合酶及突变体,并不局限于此。

[0012] 在另一优选例中,所述的解旋酶包括:T7噬菌体复制系统的解旋酶(4B)、UvrD解旋酶等。

[0013] 在另一优选例中,所述的DNA结合蛋白包括:T4噬菌体基因32蛋白、RB49噬菌体基因32蛋白、T7噬菌体复制系统的单链结合蛋白,DNA结合蛋白7等。

[0014] 所述的合成DNA的底物包括:脱氧核苷单磷酸、脱氧核苷三磷酸、或其组合。

[0015] 所述的合成RNA的底物包括:核苷单磷酸、核苷三磷酸、或其组合。

[0016] 在另一优选例中,所述的合成蛋白的底物包括:1-20种天然氨基酸、以及非天然氨基酸。

[0017] 在另一优选例中,所述无细胞的蛋白合成体系还包括外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子。

[0018] 在另一优选例中,所述的DNA分子为线性的。

[0019] 在另一优选例中,所述的DNA分子为环状的。

[0020] 在另一优选例中,所述的DNA分子含有编码外源蛋白的序列。

[0021] 在另一优选例中,所述的编码外源蛋白的序列包括基因组序列、cDNA序列。

[0022] 在另一优选例中,所述的编码外源蛋白的序列还含有启动子序列、5'非翻译序列、

3'非翻译序列。

[0023] 在另一优选例中,所述无细胞的蛋白合成体系包括选自下组的成分:聚乙二醇、蔗糖、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、醋酸钾、醋酸镁、核苷三磷酸、氨基酸、磷酸肌酸,二硫苏糖醇(DTT)、磷酸肌酸激酶、T7 RNA聚合酶、或其组合。

[0024] 本发明第三个方面提供了提供一种简单可行的、偶联DNA-to-Protein (D2P) 的体外生物合成制剂,包括:

(i) 体外合成系统中所述的细胞提取物,无细胞合成体系,DNA复制体系, DNA转录体系的混合水溶液或者冻干粉;

(ii) 在适合的条件,从而合成DNA,RNA及蛋白。

[0025] (iii) 也可孵育DNA复制体系经过T1, 再与细胞提取物及无细胞合成体系结合,从而合成DNA,RNA及蛋白。

[0026] 在另一优选例中,所述步骤(i)和(ii)中,反应温度为20-30 °C,反应时间为2-12h。

[0027] 在另一优选例中,所述步骤(iii)中,反应温度为25-65 °C。

[0028] 在另一优选例中,所述步骤(iii)中,T1反应时间为2-6 h。

[0029] 本发明第四个方面提供了一种用于体外无细胞合成蛋白的试剂盒,包括:

(k1) 第一容器,以及位于第一容器内的酵母细胞提取物;

(k2) 第二容器,以及位于第二容器内的DNA聚合酶、解旋酶、DNA结合蛋白;

(kt) 标签或说明书。

[0030] 在另一优选例中,所述的第一容器、第二容器和第三容器是同一容器或不同容器。

[0031] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括任选的选自下组的一个或多个容器:

(k3) 第三容器,以及位于第三容器的用于合成DNA的底物;

(k4) 第四容器,以及位于第四容器的用于合成RNA的底物;

(k5) 第五容器,以及位于第五容器的用于合成蛋白的底物;

(k6) 第六容器,以及位于第六容器的镁离子;

(k7) 第七容器,以及位于第七容器的钾离子;

(k8) 第八容器,以及位于第八容器的缓冲剂。

[0032] (K9) 第九容器,以及位于第九容器的聚乙二醇和蔗糖等;

本发明第五方面提供了一种无细胞合成体系,所述的合成体系将DNA复制、RNA转录和蛋白翻译偶联或整合在一个合成体系中。

[0033] 在另一优选例中,所述的合成体系包括:

(i) DNA聚合体系;

(ii) RNA转录体系;和

(iii) 蛋白质翻译体系。

[0034] 在另一优选例中,所述无细胞合成体系还包括:

(iv) 糖类;和

(v) 磷酸化合物。

[0035] 在另一优选例中,所述无细胞合成体系还包括:

(j1) 镁离子;

- (j2) 钙离子;
- (j3) 缓冲剂;
- (j4) 能量再生系统。

[0036] (j5) 聚乙二醇;

- (j6) 任选的外源蔗糖;和

- (j7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0037] 在另一优选例中,所述无细胞合成体系还包括任选的模板DNA。

[0038] 在另一优选例中,所述的(i) DNA聚合体系包括:(a) DNA聚合酶;(b) 任选的解旋酶;(c) 任选的DNA结合蛋白;和(d) 用于合成DNA的底物。

[0039] 在另一优选例中,所述的(ii) RNA转录体系包括:(e) RNA聚合酶;和(f) 用于合成RNA的底物。

[0040] 在另一优选例中,所述的(iii) 蛋白质翻译体系包括:(g) 用于合成蛋白的底物;和(h) 细胞提取物。

[0041] 在另一优选例中,所述细胞提取物的细胞来源选自下组的一种或多种类型的细胞:原核细胞和真核细胞。

[0042] 在另一优选例中,所述细胞提取物的细胞来源选自下组的一种或多种类型的细胞:大肠杆菌、细菌、哺乳动物细胞(如HF9、HeLa、CHO、HEK293)、植物细胞、酵母细胞、或其组合。

[0043] 在另一优选例中,所述的细胞提取物包括酵母细胞提取物。

[0044] 在另一优选例中,所述酵母细胞选自下组:酿酒酵母、毕氏酵母、克鲁维酵母、或其组合;较佳地,所述的酵母细胞包括:克鲁维酵母,更佳地为乳酸克鲁维酵母。

[0045] 在另一优选例中,所述的酵母细胞提取物为对酵母细胞的水性提取物。

[0046] 在另一优选例中,所述酵母细胞提取物不含酵母内源性的长链核酸分子。

[0047] 在另一优选例中,所述镁离子来源于镁离子源,所述镁离子源选自下组:醋酸镁、谷氨酸镁、或其组合。

[0048] 在另一优选例中,所述钾离子来源于钾离子源,所述钾离子源选自下组:醋酸钾、谷氨酸钾、或其组合。

[0049] 在另一优选例中,所述缓冲剂选自下组:4-羟乙基哌嗪乙磺酸、三羟甲基氨基甲烷、或其组合。

[0050] 在另一优选例中,所述的合成RNA的底物包括:核苷单磷酸、核苷三磷酸、或其组合。

[0051] 在另一优选例中,所述的合成蛋白的底物包括:1-20种天然氨基酸、以及非天然氨基酸。

[0052] 在另一优选例中,所述的合成体系是DNA复制、RNA转录和蛋白翻译的三合一的合成体系。

[0053] 在另一优选例中,所述的DNA聚合体系中,模板DNA的用量 ≤ 1 ng,较佳地 ≤ 0.1 ng,更佳地 ≤ 0.01 ng。

[0054] 在另一优选例中,所述的DNA聚合体系中,模板DNA的用量为0.0001-10 ng,较佳地0.001-1 ng,更佳地0.001-0.1 ng。

- [0055] 在另一优选例中,所述的模板DNA为环状DNA。
- [0056] 在另一优选例中,所述的模板DNA为质粒DNA。
- [0057] 在另一优选例中,所述的质粒DNA包括能够增强蛋白质合成效率的串联DNA元件。
- [0058] 在另一优选例中,所述质粒DNA包括以下元件:串联而成的酵母细胞来源的IRES增强子K1NCE102、 Ω 序列以及酵母特异性的Kozak序列。
- [0059] 在另一优选例中,所述的合成体系的体积为10-50微升,较佳地,20-40微升。
- [0060] 在另一优选例中,所述的DNA聚合体系中,所述聚合酶选自下组:phi29 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、Bst DNA聚合酶、*E. coli* DNA聚合酶、DNA聚合酶I的Klenow、或其组合。
- [0061] 在另一优选例中,所述的DNA聚合体系中,所述聚合酶为phi29 DNA聚合酶。
- [0062] 在另一优选例中,所述的DNA聚合体系中,所述聚合酶的浓度为0.0005-0.5 mg/mL,较佳地,0.01-0.2 mg/mL,更佳地,0.05-0.1 mg/mL。
- [0063] 在另一优选例中,所述的DNA复制、RNA转录和蛋白翻译不包括从合成体系去除不必要蛋白的步骤。
- [0064] 在另一优选例中,所述方法不包括从合成体系去除不必要蛋白(如DNA酶、RNA聚合酶)的步骤。
- [0065] 在另一优选例中,所述聚乙二醇选自下组:PEG3000、PEG8000、PEG6000、PEG3350、或其组合。
- [0066] 在另一优选例中,所述聚乙二醇包括分子量(Da)为200-10000的聚乙二醇,较佳地,分子量为3000-10000的聚乙二醇。
- [0067] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,聚乙二醇的浓度(w/v,例如g/ml)为0.1-8%,较佳地,0.5-4%,更佳地,1-2%。
- [0068] 在另一优选例中,所述能量再生系统选自下组:磷酸肌酸/磷酸肌酸酶系统、糖酵解途径及其中间产物能量系统、或其组合。
- [0069] 在另一优选例中,所述糖类选自下组:葡萄糖、淀粉、糖原、蔗糖、麦芽糖、环糊精、或其组合。
- [0070] 在另一优选例中,所述糖类的浓度(mmol/L)为10-100 mM,较佳地,10-60 mM,较佳地,20-50 mM,更佳地,20-30 mM。
- [0071] 在另一优选例中,所述糖类的含量(V/V)为1-10%,较佳地,3-8%,更佳地,4-6%,以无细胞合成体系的总体积计。
- [0072] 在另一优选例中,所述磷酸化合物选自下组:磷酸钾、磷酸镁、磷酸铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、或其组合。
- [0073] 在另一优选例中,所述磷酸化合物的浓度(v/v)为1-6%,较佳地,2-5%,更佳地,2-3%,以无细胞合成体系的总体积计。
- [0074] 在另一优选例中,所述磷酸化合物的浓度(mmol/L)为10-60 mM,较佳地,20-50 mM,更佳地,20-30 mM。
- [0075] 本发明第六方面提供了一种体外无细胞合成蛋白的方法,包括步骤:
- (a) 提供一混合体系,包括本发明第五方面所述的无细胞合成体系和外源的用于指导蛋白质合成的模板DNA,所述无细胞合成体系包括DNA复制体系和转录、翻译偶联的无细胞

合成体系,在适合的条件,孵育所述的DNA复制体系一段时间T1,将转录、翻译偶联的无细胞合成体系与该DNA复制体系结合,经孵育后合成由所述外源DNA编码的蛋白质。

[0076] 本发明第七方面提供了一种体外无细胞合成蛋白的方法,包括步骤:

提供一本发明第五方面所述的无细胞合成体系和用于指导蛋白质合成的模板DNA,在适合条件下,孵育所述的无细胞合成体系和用于指导蛋白质合成的模板DNA 一段时间T1,从而合成由所述模板DNA编码的蛋白质。

[0077] 在另一优选例中,所述的模板DNA为环状DNA。

[0078] 在另一优选例中,所述的模板DNA为质粒DNA。

[0079] 在另一优选例中,所述的方法还包括:(b) 任选地从所述蛋白合成体系中,分离或检测所述的由所述模板编码的蛋白质。

[0080] 在另一优选例中,所述步骤(a)中,反应温度为20-37 °C,较佳地,20-25 °C。

[0081] 在另一优选例中,所述步骤(b)中,反应时间为6-24 h,较佳地,8-16 h。

[0082] 在另一优选例中,所述模板DNA的用量 ≤ 1 ng,较佳地 ≤ 0.1 ng,更佳地 ≤ 0.01 ng。

[0083] 在另一优选例中,所述模板DNA的用量为0.0001-10 ng,较佳地0.001-1 ng,更佳地0.001-0.1 ng。

[0084] 本发明第八方面提供了一种用于体外无细胞合成的制剂,包括:

(i) 本发明第五方面所述的无细胞合成体系;和

(ii) 用于无细胞合成的辅助试剂。

[0085] 在另一优选例中,所述制剂为混合溶液或冻干粉。

[0086] 在另一优选例中,所述辅助试剂选自下组:

(j1) 镁离子;

(j2) 钙离子;

(j3) 缓冲剂;

(j4) 能量再生系统。

[0087] (j5) 聚乙二醇;

(j6) 任选的外源蔗糖; 和

(j7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0088] 在另一优选例中,所述辅助试剂还包括:

(a) 糖类;和

(b) 磷酸化合物。

[0089] 本发明第九方面提供了一种用于体外无细胞合成的试剂盒,包括:

(k1) 第一容器,以及位于第一容器内的本发明第五方面所述的无细胞合成体系;和

(kt) 标签或说明书。

[0090] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括任选的选自下组的一个或多个容器:

(k2) 第二容器,以及位于第二容器的镁离子;

(k3) 第三容器,以及位于第三容器的钾离子;

(k4) 第四容器,以及位于第四容器的缓冲剂;

(K5) 第五容器,以及位于第五容器的聚乙二醇;

- (k6) 第六容器,以及位于第六容器的任选的外源蔗糖;
- (K7) 第七容器,以及位于第七容器的任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂;
- (k8) 第八容器,以及位于第八容器的糖类;和
- (k9) 第九容器,以及位于第九容器的磷酸化合物。

[0091] 本发明第十方面提供了一种体外偶联合成DNA, mRNA和蛋白质的方法,包括步骤:

(i) 提供本发明第一方面所述的体外DNA复制体系,包括DNA聚合酶、外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子、解旋酶、DNA结合蛋白、用于合成DNA的底物;

(ii) 在适合的条件,孵育步骤(i)经过T1,再与转录与翻译偶联的无细胞合成体系结合,从而合成由所述外源DNA编码的DNA, mRNA和蛋白质;或

(iii) 在适合的条件,将DNA复制体系、转录体系、翻译体系直接混合,加入外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子,经孵育后合成由外源DNA直接编码的蛋白质。

[0092] 本发明第十一方面提供了一种体外偶联合成DNA, mRNA和蛋白质的方法,包括步骤:

(i) 提供本发明第一方面所述的体外DNA复制体系,包括DNA聚合酶、外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子、解旋酶、DNA结合蛋白;

(ii) 在适合的条件,孵育步骤(i)经过T1,再与转录与翻译偶联的无细胞合成体系结合,从而合成由所述外源DNA编码的DNA, mRNA和蛋白质;或

(iii) 在适合的条件,无需孵育步骤就可以完成外源DNA直接编码合成蛋白质。

[0093]

应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

[0094]

附图说明

[0095] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0096] 图1是体外DNA-to-Protein (D2P)的合成体系的原理图。DNA复制,转录,翻译的中心法则原理。

[0097] 图2是在phi29 DNA聚合酶复制体系中不同体积的DNA对于体外蛋白合成体系的影响示意图。phi29 DNA聚合酶的反应温度为30 °C,反应时间为6-16 h,含有萤光素酶基因的质粒为1 ng。NC为负对照,没有DNA的体外合成体系。PC为正对照,DNA来自于PCR反应,约500 ng。从图上可以看出,0.5-3微升的phi29 DNA 聚合酶复制的DNA均可以用作体外转录与翻译偶联的无细胞表达体系。

[0098] 图3是在phi29 DNA聚合酶复制体系中,不同反应时间的DNA对于体外蛋白合成体系的影响示意图。phi29 DNA聚合酶的反应温度为30 °C,反应时间为1-28天,含有萤光素酶基因的质粒为1 ng。NC为负对照,没有DNA的体外合成体系。PC为正对照,DNA来自于PCR反应,约500 ng。从图上可以看出,1-28天的phi29 DNA 聚合酶复制的DNA仍可以用作体外转录与翻译偶联的无细胞表达体系。

[0099] 图4是在复制体系中不同浓度phi29 DNA聚合酶扩增的DNA对于体外蛋白合成体系

的影响示意图。phi29 DNA聚合酶的反应温度为30 °C,反应时间为6-16 h,含有eGFP基因的质粒为1 ng,phi29聚合酶的反应浓度为0.5 mg/mL-0.8 ug/mL。NC为负对照,没有DNA的体外合成体系。PC为正对照,DNA来自于PCR反应,约500 ng。从图上可以看出,0.8 mg/mL-0.4 ug/mL的phi29 DNA聚合酶复制的DNA均可以用作体外转录与翻译偶联的无细胞表达体系。

[0100] 图5是phi29 DNA扩增体系不同时间点合成的DNA模板对于体外蛋白合成体系的影响示意图。phi29 DNA聚合酶的反应温度为20-30 °C,反应时间为0-24 h,含有eGFP基因的质粒为1 ng。NC为负对照,没有DNA的体外合成体系。PC为正对照,DNA来自于PCR反应,约500 ng。从图上可以看出,DNA扩增反应进行到6 h时,扩增得到的DNA指导合成的eGFP的量达到最高值,进入平台。

[0101] 图6是使用琼脂糖凝胶对图5中phi29 DNA扩增体系不同时间点合成的DNA量的分析示意图。从图上可以看出,DNA扩增反应进行到6 h时,扩增得到的DNA的量达到最大值,随着时间的增加进入平台,不再有显著增加。

[0102] 图7是使用Western Blot的方法检测IVDTT合成的eGFP。泳道1是加入含有eGFP编码序列的质粒的IVDTT体系,泳道2是不加入DNA模板的IVDTT体系(阴性对照)。Western Blot使用了eGFP蛋白的一抗,泳道1条带的分子量大小与理论分子量(26.7 KDa)非常接近,这表明合成的目标蛋白是正确的eGFP蛋白。

[0103] 图8是使用荧光SDS-PAGE成像方法检测IVDTT合成的eGFP蛋白。泳道1是加入含有eGFP编码序列的质粒的IVDTT体系,泳道2是不加入DNA模板的IVDTT体系(阴性对照)。在SDS-PAGE分析中,eGFP蛋白中的荧光基团在不完全变性的情况下还能够受激发并发出荧光。泳道1中检测到的荧光条带的分子量大小与eGFP的理论分子量(26.7 KDa)非常接近,这表明合成的eGFP蛋白能够受激发并发出荧光。

[0104] 图9是使用IVDTT体系合成的融合蛋白Ubiquitin-eGFP和单独eGFP受激发后发出的相对荧光值(RFU),测量了体外合成体系孵育3 h(空白的柱状图)和20 h(带有阴影的柱状图)后合成的融合蛋白中eGFP和单独的eGFP发出的相对荧光值(RFU),合成的单独eGFP作为IVDTT体系的正对照。合成的Ubiquitin-eGFP发出的相对荧光值比阴性对照(NC)的相对荧光值显著高,表明IVDTT体系合成了融合蛋白Ubiquitin-eGFP。

[0105] 图10是使用IVDTT体系合成的融合蛋白p53-eGFP和单独eGFP受激发后发出的相对荧光值,测量了体外合成体系孵育3 h(空白的柱状图)和20 h(带有阴影的柱状图)后合成的融合蛋白中eGFP和单独的eGFP发出的相对荧光值(RFU),合成的单独eGFP作为IVDTT体系的正对照。合成的p53-eGFP发出的相对荧光值比阴性对照的相对荧光值显著高,表明IVDTT体系合成了融合蛋白p53-eGFP。

[0106] 图11是使用IVDTT体系合成的融合蛋白β2AR-eGFP和单独eGFP受激发后发出的相对荧光值,测量了体外合成体系孵育3 h(空白的柱状图)和20 h(带有阴影的柱状图)后合成的融合蛋白中eGFP和单独的eGFP发出的相对荧光值(RFU),合成的单独eGFP作为IVDTT体系的正对照。合成的β2AR-eGFP发出的相对荧光值比阴性对照的相对荧光值显著高,表明IVDTT体系合成了融合蛋白β2AR-eGFP。

[0107] 图12是使用IVDTT体系合成的融合蛋白AQP1-eGFP和单独eGFP受激发后发出的相对荧光值,测量了体外合成体系孵育3 h(空白的柱状图)和20 h(带有阴影的柱状图)后合成的融合蛋白中eGFP和单独的eGFP发出的相对荧光值(RFU),合成的单独eGFP作为IVDTT

体系的正对照。合成的AQP1-eGFP发出的相对荧光值比阴性对照的相对荧光值显著高,表明IVDTT体系合成了融合蛋白AQP1-eGFP。

[0108] 图13是使用IVDTT体系合成的融合蛋白IFN- α 2A-eGFP和单独eGFP受激后发出的相对荧光值,测量了体外合成体系孵育3 h (空白的柱状图)和20 h (带有阴影的柱状图)后合成的融合蛋白中eGFP和单独的eGFP发出的相对荧光值 (RFU),合成的单独eGFP作为IVDTT体系的正对照。合成的IFN- α 2A-eGFP发出的相对荧光值比阴性对照的相对荧光值显著高,表明IVDTT体系合成了融合蛋白IFN- α 2A-eGFP。

[0109] 图14和图15是使用IVDTT体系分别合成的融合蛋白ate-H-eGFP、ate-L-eGFP和单独eGFP受激后发出的相对荧光值,测量了体外合成体系孵育3 h (空白的柱状图)和20 h (带有阴影的柱状图)后合成的融合蛋白中eGFP和单独的eGFP发出的相对荧光值 (RFU),合成的单独eGFP作为IVDTT体系的正对照。合成的ate-H-eGFP和ate-L-eGFP发出的相对荧光值均比阴性对照的相对荧光值显著高,表明IVDTT体系合成了融合蛋白ate-H-eGFP和ate-L-eGFP。

[0110] 图16 是体外DNA-to-Protein (D2P)的合成体系的优势图。

[0111]

具体实施方式

[0112] 经过广泛而深入的研究,通过大量实践和摸索,首次发明了一种经优化的可将DNA复制与体外无细胞转录、翻译相偶联或整合的三合一体系(DNA-to-Protein, D2P)。D2P体系可用极微量的模板量(用量可降低2-4个数量级或者更多),既可以有效地降低成本,可同时高效快速合成DNA, RNA 和蛋白质,大大降低了无细胞合成系统的使用复杂性与成本。与商业上的所有无细胞蛋白表达体系相比,本发明提供的D2P体外无细胞表达系统可以利用极少量的(纳克-微克)DNA,连续、简便、高效地合成特定蛋白质。具体地,用本发明的体外无细胞表达系统,所合成的荧光素酶活性的相对光单位值可高达目前商业化体系(如兔子网织红细胞体外表达体系)的约60倍,节省了使用者约4-6 h的准备时间,100-500倍左右的模板成本。

[0113] 一、DNA-to-Protein (D2P) 偶联生物合成体系的理论构建

1. 科学背景

“中心法则”是地球上生物发生发展的基本原理。它是遗传信息从DNA传递给DNA,即完成DNA的复制过程,以及从DNA传递给RNA,再从RNA传递给蛋白质,即完成遗传信息的转录和翻译的过程。这是所有有细胞结构的生物所遵循的核心法则。现代生物学的进步在很大程度上是建立在对于这一法则的理解和应用上的。比如核酸扩增技术(PCR),分子克隆,基因组改造,细胞信号调控,神经网络,疾病原理和治疗,以及重组蛋白质的表达,等等。近20年来,随着基因测序,组学,计算机和互联网技术的发展,生物学研究也取得了大量革命性的进步。然而,组成生物核心物质的DNA, RNA, 特别是蛋白质的合成和制备却依然停留在二三十年以前的水平,大大制约了相关生物学研究和和医药研发的进步。开发一种高产量、低成本的体外蛋白质生物合成系统,已成为世界范围的迫切需要。

[0114] 目前蛋白质的合成方法可以分为两种:传统的细胞蛋白质合成和体外无细胞蛋白合成。传统的蛋白质合成方法起源于1970年代,是指通过模式生物细菌、真菌、植物细胞或

动物细胞等表达外源基因的一种分子生物学技术[1-2]。随着科学技术的发展,无细胞表达体系也称为体外蛋白合成系统在1990年代应运而生[3-5],其是以外源目的mRNA或DNA为蛋白质合成模板,通过人工控制补加蛋白质合成所需的底物和转录、翻译相关蛋白因子等物质,能实现目的蛋白质的合成。体外翻译系统中表达蛋白质无需进行质粒构建、转化、细胞培养、细胞收集和破碎步骤,是一种相对快速、省时、便捷的蛋白质表达方式。

[0115] 然而,由于体外蛋白质合成体系的制备繁琐,添加辅助因子复杂,使得目前市场上所有的体外蛋白质合成产品都活性较低,且极其昂贵(100-1000倍于传统细胞合成)。目前仅见于极个别实验室中少量的活性测定和实验尝试中。发展高效、便捷、低成本的蛋白质合成方法,无疑将成为推动未来生物工业革命,科技进步,医药研发,药物生产的蒸汽机车,对于整个生物产业的进步具有革命性的作用。

[0116] 基于发明人在蛋白质合成领域基础理论、真核细胞中蛋白质合成机制、及其相关酶、和催化功能,等的超过20年的研究,我们认为最高效的生物合成系统应该来自于大自然的设计。

[0117] 2. 基本原理

大自然中细胞会保持持续的分裂,复制,生长,不间断地,大量地制造DNA, RNA和蛋白质。以简单的大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)为例,依照它们20-30分钟的复制速度,它(细胞体积 1立方微米,重量1 pg, 干重 0.4 pg, DNA 0.017 pg, RNA 0.10 pg, 蛋白质 0.20 pg)生物合成的速度是: 34 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hour}$ DNA, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hour}$ RNA, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hour}$ 蛋白质[6-8]。复制放大比例为 DNA:RNA:Protein = 1: 5.9 : 12。真核的酵母细胞(*Saccharomyces cerevisiae*, *Sc*),依照它们90分钟的复制速度,它(细胞体积 73立方微米,重量79 pg, 干重 40 pg, DNA 0.06 pg, RNA 4 pg, 蛋白质 20 pg)生物合成的速度是: 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hour}$ DNA, 36 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hour}$ RNA, 182 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hour}$ 蛋白质[9-12]。无论合成蛋白质的速度,还是从 DNA到RNA到Protein的放大比例均远大于现有的体外蛋白质合成体系。

[0118] 而这些制造过程的核心基础就是 DNA-RNA-Protein 的“中心法则”。其中每一步都是必需的,不能缺少。而实现高效率生物合成最基础的便是第一步的DNA的自我复制。例如,病毒是生物界中的复制效率最高的物种,然而当没有宿主时,其由于无法完成其自身DNA的复制(RNA病毒无法完成RNA到DNA, 然后DNA复制), 病毒的生长是完全停滞的。这一点也可以从不同物种中还是从 DNA到RNA到Protein的放大比例看出: *E. coli* 细胞的复制放大比例为 DNA:RNA:Protein = 1: 5.9 : 12,酵母细胞的复制放大比例为 DNA:RNA:Protein = 1: 64 : 330,人细胞的复制放大比例为 DNA:RNA:Protein = 1: 2: 20 [8]。如果考虑到酿酒酵母(*S. cerevisiae*)和人细胞中分别有约75%和80%的基因组能够被转录,而且在酿酒酵母和人细胞中,非编码RNA (non-coding RNA)在转录出的RNA中的比例分别超过95%和98%,只有少于5%(酵母)和2%(人)RNA编码蛋白质,则酵母细胞和人的复制放大比例分别为 DNA:mRNA:Protein = 1: 4.27 : 440和DNA:mRNA:Protein = 1:0.05:25 [13-16]。因此只有充分利用整个“中心法则”,完整的建立DNA到RNA到Protein全部路径,才有可能最大限度的提示生物合成的效率和最终蛋白质制备的产量。

[0119] 以此为依据,我们这里提出了全新的DNA-to-Protein (D2P) 偶联体外无细胞生物合成理论,将“中心法则”中的三部:DNA 复制,DNA到RNA的转录,RNA到蛋白质的翻译,全

部放在体外,以偶联的方式,进行DNA, RNA, Protein的协同合成,以达到提高生物合成效率的目的。

[0120] 3. 技术架构

D2P技术的实现包括:核酸扩增技术, RNA聚合技术,和体外蛋白翻译技术。

[0121] 3a. 核酸扩增技术包括非等温扩增技术和等温扩增技术。聚合酶链反应是核酸扩增技术的典型代表。但是PCR技术对于温度循环有依赖性,往往需要较高的温度对DNA模板进行变性和新合成DNA分子的扩增延伸,而高温能够引起体外合成体系中蛋白质因子的变性失活,所以不适合用于体外合成体系。与PCR技术相比,核酸等温扩增的特点是在特定的、比较温和的温度条件下实现核酸的扩增,因而可以将DNA复制、mRNA转录与蛋白合成进行体外偶联。同时,用于核酸等温扩增的DNA聚合酶,包括phi29 DNA聚合酶,T7 DNA聚合酶等在温度和扩增效率上都有较大的优势,这样就无需预先准备大量DNA分子,只需少量的DNA模板就可以实现蛋白质的体外合成。

[0122] 该D2P体外合成体系中使用的phi29 DNA聚合酶,T7 DNA聚合酶并非是纯粹的野生型或者突变型,将根据体外合成体系的需要,进行DNA聚合酶的保真性,合成效率,延伸能力等方面的分子改造,与单链DNA结合蛋白的融合,或者几种等温聚合酶的组合,高效地应用于D2P的合成体系中,创造出高效的D2P偶联生物合成体系。

[0123] 3b. 该D2P体外合成体系中使用的T7 RNA聚合酶具有特异性高和转录效率高的特性,能够快速高效地从DNA模板转录出大量mRNA分子。T7 RNA聚合酶配合高效的体外蛋白翻译系统,又进一步的降低了对DNA分子的量的要求。

[0124] 3c. 综上所述,构建D2P偶联体外无细胞生物合成体系,实现由微量DNA(纳克-微克级)到大量蛋白质(微克-毫克级)的合成,理论上是可行的。

[0125] 二、DNA-to-Protein (D2P) 偶联的体外无细胞生物合成体系

在实施方式中,本发明提供的体外合成体系包括:细胞提取物,4-羟乙基哌嗪乙磺酸,醋酸钾,醋酸镁,腺嘌呤核苷三磷酸(ATP),鸟嘌呤核苷三磷酸(GTP),胞嘧啶核苷三磷酸(CTP),胸腺嘧啶核苷三磷酸(TTP),氨基酸混合物,磷酸肌酸,二硫苏糖醇(DTT),磷酸肌酸激酶, RNA酶抑制剂, RNA聚合酶,亚精胺,血红素, DNA聚合酶,解旋酶, DNA结合蛋白等。

[0126] 在本发明中, RNA聚合酶没有特别限制,可以选自一种或多种RNA聚合酶,典型的RNA聚合酶为T7 RNA聚合酶。

[0127] 在本发明中, DNA聚合酶没有特别限制,能够用于恒温扩增的聚合酶,可以选自一种或多种DNA聚合酶,典型的DNA聚合酶为phi29 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、Bst DNA聚合酶等,并不局限于此。

[0128] 在本发明中,解旋酶可以选自一种或多种,典型的解旋酶为T7噬菌体复制系统的解旋酶(4B)、UvrD解旋酶等,并不局限于此。

[0129] 在本发明中, DNA结合蛋白可以选自一种或多种:T4噬菌体基因32蛋白、RB49噬菌体基因32蛋白、T7噬菌体复制系统的单链结合蛋白, DNA结合蛋白7、等,并不局限于此。

[0130] 三、DNA-to-Protein (D2P) 偶联的体外无细胞合成体系制剂

本发明提供了一种体外的偶联DNA复制、转录及翻译的无细胞的合成体系制剂,所述制剂包括:

- (i) 细胞提取物的水溶液或冻干粉;

- (ii) DNA复制反应体系的水溶液或冻干粉；
- (iii) DNA转录反应体系的水溶液或冻干粉；
- (iv) 无细胞合成体系的水溶液或冻干粉；

无细胞合成体系包括：4-羟乙基哌嗪乙磺酸，醋酸钾，醋酸镁，氨基酸混合物，磷酸肌酸，二硫苏糖醇 (DTT)，磷酸肌酸激酶，RNA酶抑制剂，聚乙二醇等反应物。

[0131] 细胞提取物，无细胞合成体系，DNA复制体系，DNA转录反应的混合冻干粉或者其中一种或多种冻干粉体系与水溶液体系的组合，在适合的条件，从而合成DNA，RNA及蛋白。也可DNA复制体系经过孵育时间T1，再与细胞提取物，DNA转录体系及无细胞合成体系结合，从而合成所述DNA，RNA及蛋白。

[0132] 所述步骤中，DNA复制反应体系的温度为25-65 °C，T1的反应时间为2-6 h。

四、DNA-to-Protein (D2P) 偶联的体外无细胞蛋白质合成试剂盒

本发明提供了一种DNA-to-Protein (D2P) 偶联的体外无细胞合成的试剂盒，包括：

- (k1) 第一容器，以及位于第一容器内的细胞提取物；
- (k2) 第二容器，以及位于第二容器内的DNA复制反应体系；
- (k3) 任选的第三容器，以及位于第三容器的DNA转录反应体系；
- (kt) 标签或说明书。

[0133] 在一优选实施方式中，所述的第一容器、第二容器和第三容器是同一容器或不同容器。

[0134] 一种特别优选的体外蛋白质合成的试剂盒包含一个体外合成体系，包括：细胞提取物，4-羟乙基哌嗪乙磺酸，醋酸钾，醋酸镁，腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP)，鸟嘌呤核苷三磷酸 (GTP)，胞嘧啶核苷三磷酸 (CTP)，胸腺嘧啶核苷三磷酸 (TTP)，氨基酸混合物，磷酸肌酸，二硫苏糖醇 (DTT)，磷酸肌酸激酶，RNA酶抑制剂，T7 RNA聚合酶，亚精胺，血红素，DNA聚合酶，RNA聚合酶，解旋酶，DNA结合蛋白。

[0135]

体外表达系统

酵母 (yeast) 兼具培养简单、高效蛋白质折叠、和翻译后修饰的优势。其中酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 是表达复杂真核蛋白质和膜蛋白的模式生物，酵母也可作为制备体外翻译系统的原料。

[0136] 克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 是一种子囊孢子酵母，其中的马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 和乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 是工业上广泛使用的酵母。与其他酵母相比，乳酸克鲁维酵母具有许多优点，如超强的分泌能力，更好的大规模发酵特性、食品安全的级别、以及同时具有蛋白翻译后修饰的能力等。

[0137] 在本发明中，酵母体外表达系统不受特别限制，一种优选的酵母体外表达系统为克鲁维酵母表达系统 (更佳地，乳酸克鲁维酵母表达系统)。

[0138] 体外的无细胞的合成体系

在一优选实施方式中，本发明的体外的无细胞的合成体系包括酵母体外合成体系。

[0139] 酵母 (yeast) 兼具培养简单、高效蛋白质折叠、和翻译后修饰的优势。其中酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 是表达复杂真核蛋白质和膜蛋白的模式生物，酵母也可作为制备体外翻译系统的原料。

[0140] 克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 是一种子囊孢子酵母, 其中的马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 和乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 是工业上广泛使用的酵母。与其他酵母相比, 乳酸克鲁维酵母具有许多优点, 如超强的分泌能力, 更好的大规模发酵特性、食品安全的级别、以及同时具有蛋白翻译后修饰的能力等。

[0141] 在本发明中, 酵母体外合成体系不受特别限制, 一种优选的酵母体外合成体系为克鲁维酵母表达系统 (更佳地, 乳酸克鲁维酵母表达系统)。

[0142] 在本发明中, 克鲁维酵母 (如乳酸克鲁维酵母) 不受特别限制, 包括任何一种能够提高合成蛋白效率的克鲁维 (如乳酸克鲁维酵母) 菌株。

[0143] 在本发明中, 所述无细胞体外合成体系包括:

- (i) DNA聚合体系;
- (ii) RNA转录体系; 和
- (iii) 蛋白质翻译体系。

[0144] 在另一优选例中, 所述无细胞合成体系还包括:

- (iv) 糖类; 和
- (v) 磷酸化合物。

[0145] 在另一优选例中, 所述糖类选自下组: 葡萄糖、淀粉、糖原、蔗糖、麦芽糖、环糊精、或其组合。

[0146] 在另一优选例中, 所述糖类的浓度 (mmol/L) 为 10—100 mM, 更佳地, 10—60 mM, 更佳地, 20—50 mM, 更佳地, 20—30 mM。

[0147] 在另一优选例中, 所述糖类的含量 (V/V) 为 1—10%, 更佳地, 3—8%, 更佳地, 4—6%, 以无细胞合成体系的总体积计。

[0148] 在另一优选例中, 所述磷酸化合物选自下组: 磷酸钾、磷酸镁、磷酸铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、或其组合。

[0149] 在另一优选例中, 所述磷酸化合物的浓度 (v/v) 为 1—6%, 更佳地, 2—5%, 更佳地, 2—3%, 以无细胞合成体系的总体积计。

[0150] 在本发明中, 所述酵母细胞提取物在体外合成体系中的比例不受特别限制, 通常所述酵母细胞提取物的含量 (wt%) 为 10%—95%, 更佳地, 20%—80%, 更佳地, 40%—60%, 以所述合成体系的总重量计。

[0151] 在本发明中, 所述的酵母细胞提取物不含完整的细胞, 典型的酵母细胞提取物包括用于蛋白翻译的核糖体、转运RNA、氨酰tRNA合成酶、蛋白质合成需要的起始因子和延伸因子以及终止释放因子。此外, 酵母提取物中还含有一些源自酵母细胞的细胞质中的其他蛋白, 尤其是可溶性蛋白。

[0152] 在本发明中, 所述的酵母细胞提取物所含蛋白含量为 20—100 mg/mL, 较佳为 50—100 mg/mL。所述的测定蛋白含量方法为考马斯亮蓝测定方法。

[0153] 在本发明中, 所述的酵母细胞提取物的制备方法不受限制, 一种优选的制备方法包括以下步骤:

- (i) 提供酵母细胞;
- (ii) 对酵母细胞进行洗涤处理, 获得经洗涤的酵母细胞;
- (iii) 对经洗涤的酵母细胞进行破细胞处理, 从而获得酵母粗提物;

(iv) 对所述酵母粗提物进行固液分离, 获得液体部分, 即为酵母细胞提取物。

[0154] 在本发明中, 所述的固液分离方式不受特别限制, 一种优选的方式为离心。

[0155] 在一优选实施方式中, 所述离心在液态下进行。

[0156] 在本发明中, 所述离心条件不受特别限制, 一种优选的离心条件为5000-100000 g, 较佳地, 8000-30000 g。

[0157] 在本发明中, 所述离心时间不受特别限制, 一种优选的离心时间为0.5 min-2 h, 较佳地, 20 min-50 min。

[0158] 在本发明中, 所述离心的温度不受特别限制, 优选的, 所述离心在1-10 °C下进行, 较佳地, 在2-6 °C下进行。

[0159] 在本发明中, 所述的洗涤处理方式不受特别限制, 一种优选的洗涤处理方式为采用洗涤液在pH为7-8(较佳地, 7.4)下进行处理, 所述洗涤液没有特别限制, 典型的所述洗涤液选自下组: 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾、醋酸钾、醋酸镁、或其组合。

[0160] 在本发明中, 所述破细胞处理的方式不受特别限制, 一种优选的所述的破细胞处理包括高压破碎、冻融(如液氮低温)破碎。

[0161] 所述体外蛋白质合成体系中的核苷三磷酸混合物为腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶核苷三磷酸。在本发明中, 各种单核苷酸的浓度没有特别限制, 通常每种单核苷酸的浓度为0.5-5 mM, 较佳地为1.0-2.0 mM。

[0162] 所述体外合成体系中的氨基酸混合物可包括天然或非天然氨基酸, 可包括D型或L型氨基酸。代表性的氨基酸包括(但并不限于) 20种天然氨基酸: 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。每种氨基酸的浓度通常为0.01-0.5 mM, 较佳地0.02-0.2 mM, 如0.05、0.06、0.07、0.08 mM。

[0163] 在一优选实施方式中, 所述体外合成体系还含有聚乙二醇类似物。

[0164] 在本发明中, 代表性的PEG例子包括(但并不限于): PEG3000, PEG8000, PEG6000和PEG3350。应理解, 本发明的体系还可包括其他各种分子量的聚乙二醇(如PEG200、400、1500、2000、4000、6000、8000、10000等)。

[0165] 在优选例中, 所述体外合成体系还含有蔗糖。蔗糖的浓度没有特别限制, 通常, 蔗糖的浓度(w/v)为0.2-4%, 较佳地, 0.5-4%, 更佳地, 0.5-1%, 以所述合成体系的总体积计。

[0166] 在优选例中, 所述体外合成体系还含有血红素。血红素的浓度没有特别限制, 通常, 血红素的浓度为0.01-0.1 mM, 较佳地, 0.02-0.08 mM, 更佳地, 0.03-0.05 mM, 最佳地, 0.04 mM。

[0167] 在优选例中, 所述体外合成体系还含有亚精胺。亚精胺的浓度没有特别限制, 通常, 亚精胺的浓度为0.05-1 mM, 较佳地, 0.1-0.8mM, 更佳地, 更佳地, 0.2-0.5 mM, 更佳地, 0.3-0.4 mM, 最佳地, 0.4 mM。

[0168] 在优选例中, 所述体外合成体系还含有缓冲剂, 所述缓冲剂的成分不受特别限制, 一种优选的缓冲剂含有4-羟乙基哌嗪乙磺酸、和/或Tris缓冲液。在本发明中, 所述缓冲剂还可含有其他缓冲成分, 如醋酸钾、醋酸镁, 从而形成pH为6.5-8.5(优选7.0-8.0)的反应液或反应缓冲液。在本发明中, 缓冲剂的类型和含量不受特别限制。通常, 缓冲剂的浓度为1-200 mM或1-100 mM, 较佳地, 5-50 mM。

[0169] 一种特别优选的体外合成体系,除了酵母提取物,还含有选自下组的一种或多种或全部成分:0.05-0.1 mg/mL phi29DNA聚合酶,0.01-0.05 mg/mL RNA聚合酶,22 mM,pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,30-150 mM醋酸钾,1.0-5.0 mM醋酸镁,1.5-4 mM核苷三磷酸混合物,0.08-0.24 mM的氨基酸混合物,25 mM磷酸肌酸,1.7 mM二硫苏糖醇,0.27 mg/mL磷酸肌酸激酶,0.5%-2%蔗糖,0.027-0.054 mg/mL T7 RNA聚合酶,0.03-0.04 mM的血红素,0.3-0.4 mM的亚精胺,1%-10%聚乙二醇,10-100 mM葡萄糖,10-60 mM磷酸钾。

[0170]

外源蛋白的编码序列(模板DNA)

如本文所用,术语“外源蛋白的编码序列”与“外源模板DNA”、“模板DNA”可互换使用,均指外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子。在本发明中,所述的DNA分子为环状的或质粒DNA。所述的DNA分子含有编码外源蛋白的序列。在本发明中,所述的编码外源蛋白的序列的例子包括(但并不限于):基因组序列、cDNA序列。所述的编码外源蛋白的序列还含有启动子序列、5'非翻译序列、3'非翻译序列。

[0171] 在本发明中,所述外源DNA的选择没有特别限制,通常,外源DNA选自下组:编码荧光素蛋白、或荧光素酶(如萤火虫荧光素酶)、绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、氨酰tRNA合成酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、过氧化氢酶、肌动蛋白、抗体的可变区域的外源DNA、荧光素酶突变体的DNA、或其组合。

[0172] 外源DNA还可以选自下组:编码 α -淀粉酶、肠道菌素A、丙型肝炎病毒E2糖蛋白、胰岛素前体、干扰素 α A、白细胞介素-1 β 、溶菌酶、血清白蛋白、单链抗体段(scFv)、甲状腺素运载蛋白、酪氨酸酶、木聚糖酶的外源DNA、或其组合。

[0173] 在一优选实施方式中,所述外源DNA编码选自下组的蛋白:绿色荧光蛋白(enhanced GFP, eGFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、大肠杆菌 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, LacZ)、人赖氨酸-tRNA合成酶(Lysine-tRNA synthetase)、人亮氨酸-tRNA合成酶(Leucine-tRNA synthetase)、拟南芥甘油醛3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、鼠过氧化氢酶(Catalase)、或其组合。

[0174] 在本发明中,可以将有价值的模板DNA包括在本发明的无细胞合成体系中,也可以根据感兴趣的外源蛋白在本发明的无细胞合成体系中加入相应的外源模板DNA。

[0175] 本发明的主要优点包括:

1) 首次在体外的一个体系中完成从DNA到RNA到蛋白质的三步扩增偶联反应。

[0176] 2) 本发明的体系可以用于同时体外合成DNA, RNA, 蛋白质。

[0177] 3) 本发明的体系可以用于快速的由极微量的DNA模板直接生成目标蛋白质。

[0178] 4) 本发明的制剂可以由微量DNA为模板直接完成体外蛋白质合成,比用RNA或者DNA为模板的体外蛋白表达更简单快捷,且高效。

[0179] 5) 本发明的制剂可以用于大量目标蛋白的合成,同时易保存,易使用,不需要额外的添加剂。

[0180] 6) 本发明的试剂盒可以用于微量DNA或者质粒为模板的体外蛋白质合成,比用RNA或者DNA为模板的体外蛋白表达更简单快捷,且高效。

[0181] 7) 本发明的D2P体外表达系统可以用于表达多种复杂蛋白,且能够获得较高的蛋白含量。

[0182] 8) 本发明的D2P体外表达系统操作简单,快捷,且高效地表达多种蛋白,便于高通量蛋白质的快速高效合成,远优于现有的体外合成试剂盒和传统的细胞内蛋白合成体系。

[0183] 与传统的细胞蛋白表达系统相比,本发明的D2P体外无细胞生物合成系统省略了耗时耗力的大量分子克隆,转化,细胞培养过程。与传统的体外蛋白表达系统相比,本发明的D2P体外无细胞生物合成系统省略了大量DNA样本的制备和浓缩过程,省略了mRNA 制备过程,极大地提高了工作效率,提升了合成效率,合成的蛋白质更易于提纯,为使用者节省大量时间和成本,并使得大规模,高通量的蛋白质制造成为可能。

[0184]

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0185] 如无特别说明,则本发明实施例中所用的材料和试剂均为市售产品。

[0186]

实施例1:使用phi29 DNA聚合酶对质粒模板进行扩增

1.1 DNA扩增体系的配制:终浓度为20-30 μM 的随机引物,0.05-0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质粒模板,0.5-1 mM的dNTP,2 \times BSA,0.05-0.1 mg/mL的phi29 DNA聚合酶,1 \times phi29反应缓冲液(成分为50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM DTT, pH7.5)。

[0187] 1.2 体外质粒模板DNA的扩增反应:将上述的反应体系放置于20-30 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中,静置6-12 h,通常为过夜反应。

[0188]

实施例2:使用扩增的模板DNA进行体外蛋白质的合成

2.1 体外蛋白质合成体系:终浓度为22 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,30-150 mM醋酸钾,1.0-5.0 mM醋酸镁,1.5-4 mM核苷三磷酸混合物(腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶核苷三磷酸),0.08-0.24 mM的氨基酸混合物(甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸),25 mM磷酸肌酸,1.7 mM二硫苏糖醇,0.27 mg/mL磷酸肌酸激酶,0.027-0.054 mg/mL T7 RNA聚合酶,1% - 4%的聚乙二醇,0.5% - 2%的蔗糖,最后加入50%体积的酵母细胞提取物;

2.2 体外蛋白质合成反应:向上述30 μL 反应体系中加入0.5-3 μL 扩增后的模板DNA,放置在20-30 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中,静置反应2-20 h;

2.3 萤火虫萤光素酶 (Firefly luciferase, Fluc) 活性测定:反应结束后,在96孔白板或384孔白板中加入等体积的底物荧光素 (luciferine),立即放置于Envision 2120多功能酶标仪 (Perkin Elmer), 读数,检测萤火虫萤光素酶活性,相对光单位值 (Relative Light Unit, RLU) 作为活性单位,如图2和图3所示。

[0189] 2.4 绿色荧光蛋白 (eGFP) 活性测定:反应结束后,在384孔黑板中加入10 μL 反应体系,置于Tecan Infinite F200荧光分光光度计中读数,检测绿色荧光蛋白受激发后放出的相对荧光单位值 (Relative Fluorescence Unit, RFU) 作为活性单位,如图4和图5所

示。

[0190]

实施例3:不同体积的phi29扩增体系对于体外蛋白合成效率的影响

3.1 使用phi29 DNA聚合酶扩增含有Fluc编码DNA序列的模板质粒,置于20-30 °C的环境中,过夜静置反应;

3.2 分别取0.5、1、2和3 μL的上述DNA扩增体系,加入到30 μL体外蛋白合成体系中,同时加入使用普通PCR的方法制备的模板DNA作为阳性对照 (positive control, PC),不加入任何模板的体外蛋白合成体系作为阴性对照 (negative control, NC),每个实验组设置3个平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应2-20 h;

3.3 合成的Fluc活性的测定。

[0191]

实施例4:测定反应不同天数的phi29 DNA扩增体系对体外蛋白合成的影响

4.1 将DNA扩增体系置于20-30 °C的环境中1、7、14、21和28天,在65 °C环境中加热10 min来终止反应,并将终止的反应体系置于-20 °C保存;

4.2 向30 μL体外蛋白合成体系中加入0.5-3 μL的反应不同天数的DNA扩增样品,并设置对照和平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应2-20 h;

4.3 合成的Fluc活性的测定。

[0192]

实施例5:不同浓度的phi29 DNA聚合酶扩增的DNA模板对体外蛋白合成体系的影响

5.1 将DNA扩增体系中的phi29的浓度最高设置为0.8 mg/mL,按照2/3的比例向低浓度稀释,共设置个20个不同的phi29浓度,利用这20个DNA扩增体系对含有eGFP编码DNA序列的模板质粒进行扩增,置于20-30 °C的环境中,过夜静置反应;

5.2 向30 μL体外蛋白合成体系中加入0.5-3 μL上述DNA扩增体系,放置在20-30 °C的环境中,静置反应2-20 h;

5.3 合成的eGFP活性的测定。

[0193]

实施例6:测定不同反应时间点的phi29 DNA扩增体系对体外蛋白合成体系的影响

6.1 将以含有eGFP编码DNA序列的质粒为模板的phi29 DNA扩增体系在不同的反应时间点终止反应,并保存于-20 °C待用,不同的反应时间点分别为0 min、5 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h和24 h;

6.2 向30 μL体外蛋白合成体系中加入0.5-3 μL上述不同反应时间点终止的DNA扩增体系,并设置对照和平行实验,置于在20-30 °C的环境中,静置反应2-20 h;

6.3 合成的eGFP蛋白活性的测定。

[0194]

实施例7:使用Western Blot的方法检测IVDTT合成的目标蛋白

7.1 将用于合成eGFP蛋白的IVDTT体系通过加入Loading Buffer和加热的方法完全变性;

7.2 将上述变性的样品进行SDS-PAGE电泳,并转移到PVDF膜上;

7.3 PVDF膜经过封闭,孵育一抗和二抗等步骤后,进行压片曝光处理,其中使用的一抗

是特异性识别eGFP蛋白的抗体；

7.4 对Western Blot的结果进行分析。

[0195]

实施例8:使用荧光SDS-PAGE的方法检测IVDTT合成的目标蛋白

8.1 将用于合成eGFP蛋白的IVDTT体系通过加入Loading Buffer的方法非完全变性；

8.2 将上述变性的样品进行SDS-PAGE电泳；

8.3 将上述SDS-PAGE胶置于凝胶成像系统中,并对其进行激发,拍摄荧光图像；

8.4 对上述荧光SDS-PAGE图像进行分析。

[0196]

实施例9:使用IVDTT体系合成蛋白Ubiquitin

9.1 Ubiquitin蛋白是含有76个氨基酸残基,通过共价方式连接到其他蛋白上,构成一种重要的翻译后修饰,可以介导包括促进蛋白降解等多种不同的细胞进程。人体细胞中的Ubiquitin是由四种基因编码的,其中UBA52和RPS27A中含有单拷贝的Ubiquitin的编码序列,而另外两个基因UBB和UBC则含有多拷贝的Ubiquitin编码序列。

[0197] 此处我们选择来源于基因RPS27A的Ubiquitin编码序列,cDNA序列是从Hela细胞转录组逆转录后产物中扩增得到的,并将其构建到IVDTT表达质粒中。

[0198] 9.2 在IVDTT表达质粒中,我们构建了一个eGFP的编码序列,位于目标蛋白编码序列的3'端,使表达出的蛋白为目标蛋白和eGFP的融合蛋白,中间使用含有9个氨基酸残基的肽段相连,可以通过检测合成的eGFP的量来快速确定目标蛋白的表达量。在本实施例中,该融合蛋白则为Ubiquitin和eGFP的融合蛋白,我们命名为Ubiquitin-eGFP。

[0199] 9.3 向含有phi29 DNA聚合酶的扩增体系中加入含有Ubiquitin-eGFP和eGFP编码序列的质粒,并将反应体系置于20-30 °C的环境中,过夜反应。

[0200] 9.4取1 μL的上述DNA扩增体系,加入到30 μL体外蛋白合成体系中,将不加入任何模板的体外蛋白合成体系作为阴性对照 (negative control, NC),每个实验组设置3个平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应3-20 h;

9.5 合成的eGFP活性的测定。

[0201]

实施例10:使用IVDTT体系合成蛋白p53的核心结构域

10.1 蛋白p53是肿瘤抑制因子,能够与非常多种蛋白相互作用,在细胞中发挥非常重要的作用,本身也具有比较复杂的结构。P53核心结构域含有221个氨基酸残基,在很多种类的癌症细胞中,几乎所有的能够使p53失活的突变都位于核心结构域中,所以对这一结构域的研究对于了解癌症的发生具有重要作用。

[0202] 10.2 将p53核心结构域的编码序列构建入IVDTT的表达质粒中,编码含有eGFP的融合蛋白p53-eGFP。

[0203] 10.3 向含有phi29 DNA聚合酶的扩增体系中加入含有p53-eGFP和eGFP编码序列的质粒,并将反应体系置于20-30 °C的环境中,过夜反应。

[0204] 10.4取1 μL的上述DNA扩增体系,加入到30 μL体外蛋白合成体系中,将不加入任何模板的体外蛋白合成体系作为阴性对照 (negative control, NC),每个实验组设置3个平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应3-20 h;

10.5 合成的eGFP活性的测定。

[0205]

实施例11:使用IVDTT体系合成膜蛋白 β 2AR

11.1 G蛋白偶联受体 (G protein coupled receptor, GPCR) 是一类含有7个跨膜区的膜蛋白,能够接受外界信号,并将其传导到细胞内,通过下游的G蛋白复合物引起一系列不同的细胞进程,是一类非常重要的膜蛋白分子,是很多种药物的靶点蛋白,针对这类蛋白的研究显得至关重要。 β 2肾上腺素受体 (β 2-adrenergic receptor, β 2AR) 是被研究的比较多的一种GPCR蛋白,含有413个氨基酸残基,Robert J. Lefkowitz和Brian K. Kobilka因为对其研究被授予2012年诺贝尔化学奖。

[0206] 11.2 将 β 2AR的编码序列构建入IVDTT的表达质粒中,编码含有eGFP的融合蛋白 β 2AR-eGFP。

[0207] 11.3 向含有phi29 DNA聚合酶的扩增体系中加入含有 β 2AR-eGFP和eGFP编码序列的质粒,并将反应体系置于20-30 °C的环境中,过夜反应。

[0208] 11.4取1 μ L的上述DNA扩增体系,加入到30 μ L体外蛋白合成体系中,将不加入任何模板的体外蛋白合成体系作为阴性对照 (negative control, NC),每个实验组设置3个平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应3-20 h;

11.5 合成的eGFP活性的测定。

[0209]

实施例12:使用IVDTT体系合成膜蛋白水通道蛋白AQP1

12.1 水通道蛋白1 (Aquaporin1, AQP1) 是一种含有6个跨膜螺旋的膜蛋白,含有269个氨基酸残基,一般会形成四聚体,但是每个单独的AQP1都能形成独立的水通道。水通道能够允许水分子沿着渗透压梯度快速转移,对于维持细胞渗透压具有重要作用。Peter Agre由于对AQP1的研究被授予2003年诺贝尔化学奖。

[0210] 12.2 将AQP1的编码序列构建入IVDTT的表达质粒中,编码含有eGFP的融合蛋白AQP1-eGFP。

[0211] 12.3 向含有phi29 DNA聚合酶的扩增体系中加入含有AQP1-eGFP和eGFP编码序列的质粒,并将反应体系置于20-30 °C的环境中,过夜反应。

[0212] 12.4取1 μ L的上述DNA扩增体系,加入到30 μ L体外蛋白合成体系中,将不加入任何模板的体外蛋白合成体系作为阴性对照 (negative control, NC),每个实验组设置3个平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应3-20 h;

12.5 合成的eGFP活性的测定。

[0213]

实施例13:使用IVDTT合成干扰素IFN- α 2A

13.1 干扰素 (interferon, IFN) 是人体内一种重要的细胞因子,在一些病原体存在时,体内某些细胞能够合成和分泌干扰素,能够引起干扰素分泌的病原体包括病毒、细菌、寄生虫和癌细胞等。除了抵御病原体入侵外,干扰素还有其他功能,如活化一些免疫细胞和提高病原体的呈递效率。在临床上干扰素可以用于抗病毒和晚期癌症的治疗,所以对于干扰素的研究和生产对于科研和临床应用均有非常重要的作用。在本实施例中,我们利用IVDTT体系合成干扰素IFN- α 2A。

[0214] 13.2 将IFN- α 2A的编码序列构建入IVDTT的表达质粒中,编码含有eGFP的融合蛋白IFN- α 2A-eGFP。

[0215] 13.3 向含有phi29 DNA聚合酶的扩增体系中加入含有IFN- α 2A-eGFP和eGFP编码序列的质粒,并将反应体系置于20-30 °C的环境中,过夜反应。

[0216] 13.4取1 μ L的上述DNA扩增体系,加入到30 μ L体外蛋白合成体系中,将不加入任何模板的体外蛋白合成体系作为阴性对照 (negative control, NC),每个实验组设置3个平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应3-20 h;

13.5 合成的eGFP活性的测定。

[0217]

实施例14:使用IVDTT体系合成anti-PD-L1抗体Atezolizumab

14.1 PD1 (programmed death 1) 和其两个底物PD-L1和PD-L2是T细胞介导的免疫应答的共抑制分子。在2016年和2017年,FDA批准了几个针对PD-L1的单克隆抗体应用到临床几种癌症的治疗上,如atezolizumab、durvalumab和avelumab等,而且越来越多的针对PD1和PD-L1的单克隆抗体进入临床实验。抗体等蛋白质药物在临床上的应用越来越广泛,针对蛋白质药物的生产的研究也越来越受到重视,如何高效和低成本的生产蛋白药物成为研究的热门方向。在本实施例中,我们利用IVDTT体系分别表达Atezolizumab的重链 (Heavy chain, ate-H) 和轻链 (light chain, ate-L)。

[0218] 14.2 将ate-H和ate-L的编码序列构建入IVDTT的表达质粒中,编码含有eGFP的融合蛋白ate-H-eGFP和ate-L-eGFP。

[0219] 14.3 向含有phi29 DNA聚合酶的扩增体系中加入含有ate-H-eGFP、ate-L-eGFP和eGFP编码序列的质粒,并将反应体系置于20-30 °C的环境中,过夜反应。

[0220] 14.4取1 μ L的上述DNA扩增体系,加入到30 μ L体外蛋白合成体系中,将不加入任何模板的体外蛋白合成体系作为阴性对照 (negative control, NC),每个实验组设置3个平行实验,置于20-30 °C的环境中,反应3-20 h;

14.5 合成的eGFP活性的测定。

[0221]

实验结果

1. 体外DNA-to-Protein (D2P) 的合成体系的原理。

[0222] 如图1所示,DNA复制,mRNA转录和蛋白翻译是自然界中心法则主要遗传信息传递途径,也是此专利的核心理论。

[0223]

2. 不同体积的phi29扩增体系对于体外蛋白合成效率的影响

从图2可以看出,0.5-3 μ L的Phi29 DNA 聚合酶扩增的DNA均可以用作体外转录与翻译偶联的体外蛋白合成体系。其中,无论是0.5 μ L还是3 μ L的DNA扩增体系用于体外蛋白合成的结果与正对照无明显差异,相对光单位值 (Relative Light Unit,RLU) 达到 1×10^9 。

[0224]

3. 测定反应不同天数的phi29 DNA扩增体系对体外蛋白合成的影响

从图3可以看出,phi29 DNA聚合酶反应时间为1-28天,含有荧光素酶基因的质粒为1

ng,所合成的DNA并没有因时间长而产量增加或是降低。NC为负对照,没有DNA的体外合成体系。PC为正对照,DNA来自于PCR反应,约500 ng。1-28天的phi29 DNA聚合酶复制的DNA仍可以用作转录与翻译偶联的体外蛋白合成体系。

[0225]

4.不同浓度的phi29 DNA聚合酶扩增的DNA模板对体外蛋白合成体系的影响

从图4可以看出,当phi29 DNA聚合酶反应浓度为0.5 mg/mL-0.8 ug/mL时,扩增得到的DNA模板均可以用作转录与翻译偶联的体外蛋白合成体系,尤其0.8 mg/mL-0.4 ug/mL的phi29 DNA聚合酶复制的DNA与正对照无显著差异。

[0226]

5.测定不同反应时间点的phi29 DNA扩增体系对体外蛋白合成体系的影响

从图5可以看出,随着反应时间的延长,phi29扩增出的DNA量经历一个逐渐增加然后到达平台的过程,显示为合成的eGFP的量逐渐增加,然后达到一个平台。从合成的eGFP的量来判断,在反应进行6 h后扩增的DNA量就已经达到平台。从图6可以看出,phi29扩增产生的DNA量同样在6 h达到了最大值,与合成的eGFP产量的趋势类似。所以通常可以把phi29 DNA扩增体系的反应时间最少定为6 h,通常为过夜反应。

[0227]

6.使用Western Blot和荧光SDS-PAGE的方法检测IVDTT合成的目标蛋白

从图7可以看出,在加入含有eGFP编码序列质粒的IVDTT体系的泳道1中,Western Blot检测到的条带的分子量大小与eGFP的理论分子量(26.7 KDa)非常接近,而且使用的是抗eGFP的抗体,综上IVDTT合成的目标蛋白是eGFP。从图8可以看出,在加入含有eGFP编码序列质粒的IVDTT体系的泳道1中,检测到的荧光条带的分子量大小与eGFP的理论分子量(26.7 KDa)非常接近,而且使用的激发光和受激后的发射光的波长特征与eGFP类似,这表明IVDTT体系中检测到的荧光信号是由合成的eGFP蛋白发出的。综上所述,IVDTT体系能够合成正确折叠并能受激发出荧光的有活性的eGFP蛋白,而eGFP蛋白可以用于IVDTT体系合成目标蛋白的指示标签。

[0228]

7.IVDTT体系能够合成蛋白质Ubiquitin

从图9可以看出,合成的融合蛋白Ubiquitin-eGFP受激发后发出的荧光值在3小时和20小时分别达到72 RFU和88 RFU,而阴性对照(NC)的荧光值分别为22 RFU和35 RFU,表明IVDTT体系中合成了Ubiquitin-eGFP。单独的eGFP蛋白作为阳性对照,其荧光值在3小时和20小时分别达到了207 RFU和232 RFU。

[0229]

8.IVDTT体系能够合成p53核心结构域

从图10可以看出,合成的融合蛋白p53-eGFP受激发后发出的荧光值在3小时和20小时分别达到256 RFU和354 RFU,而阴性对照(NC)的荧光值分别为16 RFU和35 RFU,表明IVDTT体系中合成了p53-eGFP。单独的eGFP蛋白作为阳性对照,其荧光值在3小时和20小时分别达到了231 RFU和363 RFU。

[0230]

9.IVDTT体系能够合成膜蛋白β2AR

从图11可以看出,合成的融合蛋白β2AR-eGFP受激发后发出的荧光值在3小时和20小时

分别达到271 RFU和362 RFU,而阴性对照 (NC) 的荧光值分别为16 RFU和35 RFU,表明IVDTT体系中合成了 β 2AR-eGFP。单独的eGFP蛋白作为阳性对照,其荧光值在3小时和20小时分别达到了231 RFU和363 RFU。

[0231]

10. IVDTT体系能够合成膜蛋白AQP1

从图12可以看出,合成的融合蛋白AQP1-eGFP受激发后发出的荧光值在3小时和20小时分别达到331 RFU和491 RFU,而阴性对照 (NC) 的荧光值分别为16 RFU和35 RFU,表明IVDTT体系中合成了AQP1-eGFP。单独的eGFP蛋白作为阳性对照,其荧光值在3小时和20小时分别达到了231 RFU和363 RFU。

[0232]

11. IVDTT体系能够合成干扰素IFN- α 2A

从图13可以看出,合成的融合蛋白IFN- α 2A-eGFP受激发后发出的荧光值在3小时和20小时分别达到399 RFU和562 RFU,而阴性对照 (NC) 的荧光值分别为16 RFU和35 RFU,表明IVDTT体系中合成了IFN- α 2A-eGFP。单独的eGFP蛋白作为阳性对照,其荧光值在3小时和20小时分别达到了231 RFU和363 RFU。

[0233]

12. IVDTT体系能够分别合成anti-PD-L1的单克隆抗体Atezolizumab的重链和轻链

从图14和图15可以看出,合成的融合蛋白ate-H-eGFP受激发后发出的荧光值在3小时和20小时分别达到96 RFU和179 RFU,合成的融合蛋白ate-L-eGFP受激发后发出的荧光值在3小时和20小时分别达到378 RFU和544 RFU,而阴性对照 (NC) 的荧光值分别为16 RFU和35 RFU,表明IVDTT体系中分别合成了ate-H-eGFP和ate-L-eGFP。单独的eGFP蛋白作为阳性对照,其荧光值在3小时和20小时分别达到了231 RFU和363 RFU。

[0234]

13. 体外DNA-to-Protein (D2P) 的合成体系的优势

从图16和表1可以看出,体外DNA-to-Protein (D2P) 的合成体系的优势在于用微量的DNA当模板,常温下快速地实现了体外蛋白的表达,并能长期保存,大大降低DNA的成本,缩短制备DNA模板所需的时间、步骤,提高体外蛋白质合成的效率。

[0235] 表 1. D2P技术的IVDTT与传统的以PCR制备DNA模板的IVTT的比较

	IVDTT	传统 IVTT
30 μ L 反应体系需要的 DNA 模板量	0.01 ng	500 ng
DNA 模板制备方法	phi29 常温扩增, 反应体系和操作简单	PCR 扩增, 反应体系和操作复杂
DNA 模板制备时间	最少 6 h	至少 2 h
DNA 模板制备成本	少	多

参考文献:

1. Wingfield, P.T. Overview of the purification of recombinant proteins. *Current protocols in protein. science* , 2015; 80: 611-35.
2. Structural Genomics, C., et al. Protein production and purification. *Nature methods* , 2008; 5: 135-146.
3. Jermutus, L., et al. Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Current opinion in biotechnology*, 1998; 9: 534-548.
4. Katzen, F., et al. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in biotechnology*, 2005; 23: 150-156.
5. Endo Y., et al. *Cell-Free Protein Production: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 2010; vol. 607.
6. Kubitschek, H.E., and Friske, J.A. Determination of bacterial cell volume with the Coulter Counter. *Journal of bacteriology*, 1986; 168: 1466-1467.
7. Philips R., *Physical biology of cell*, 2009;26.
- 8.<https://www.thermofisher.com/cn/zh/home/references/ambion-tech-support/rna-tools-and-calculators/macromolecular-components-of-e.html>
9. Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods in enzymology*, 2002; 350:3-41.
10. Haddad, S.A., and Lindegren, C.C. A method for determining the weight of an individual yeast cell. *Applied microbiology*, 1953; 1: 153-156.
- 11.<https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/molecular-facts-and-figures.pdfsvrsn=4>
- 12.<http://book.bionumbers.org/what-is-the-macromolecular-composition-of-the-cell/>
13. Morris, K.V., and Mattick, J.S. The rise of regulatory RNA. *Nature*

reviews. Genetics, 2014; 15: 423-437

14. Wahlestedt, C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. Nature reviews. Drug discovery, 2013; 12: 433-446

15. Samanta, M.P., et al. Global identification of noncoding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating an essential RNA processing pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006; 103: 4192-4197

16. Niederer, R.O., et al. sLong Noncoding RNAs in the Yeast *S. cerevisiae*. Advances in experimental medicine and biology, 2017; 1008: 119-132

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

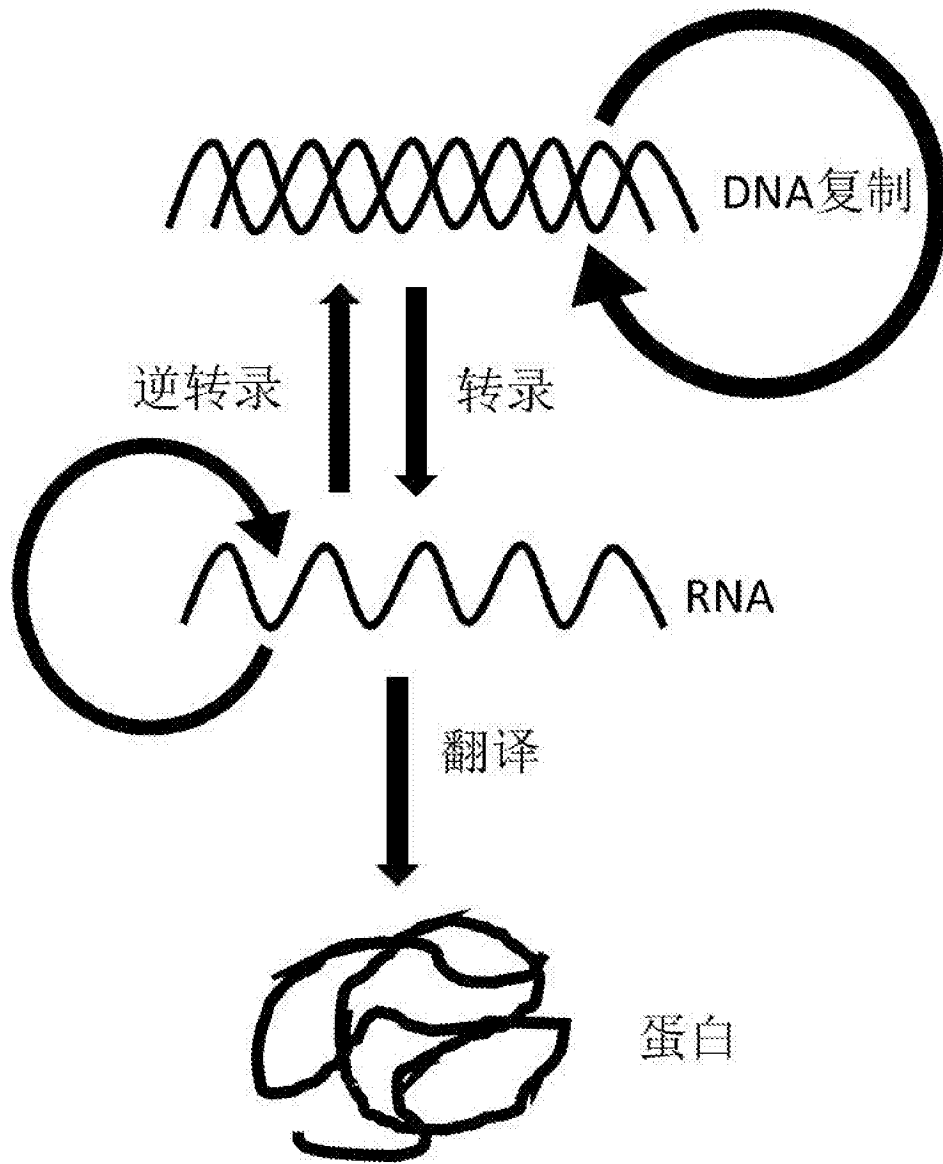


图1

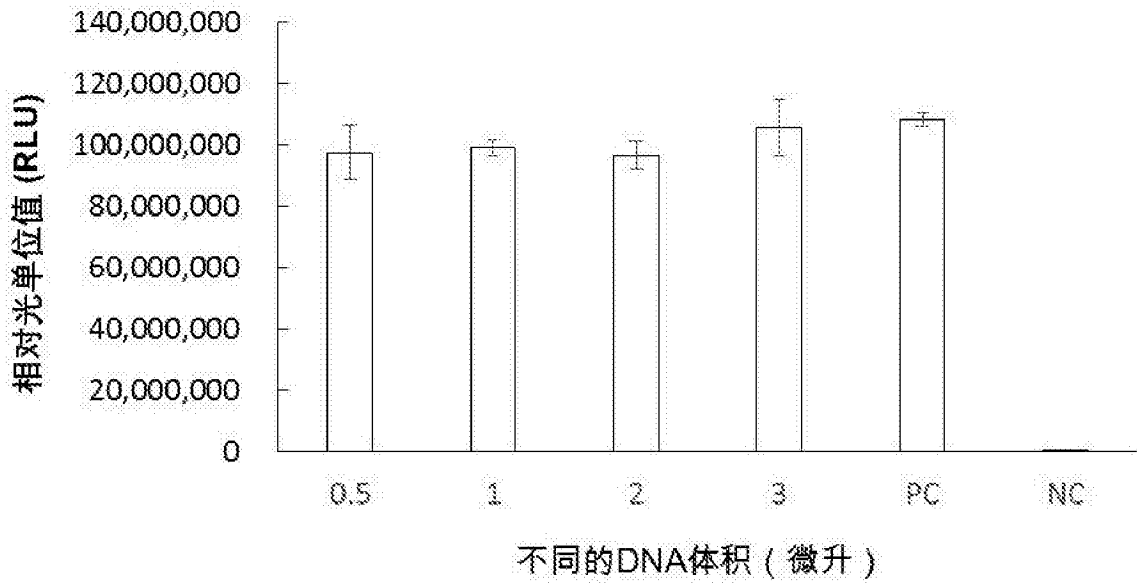


图2

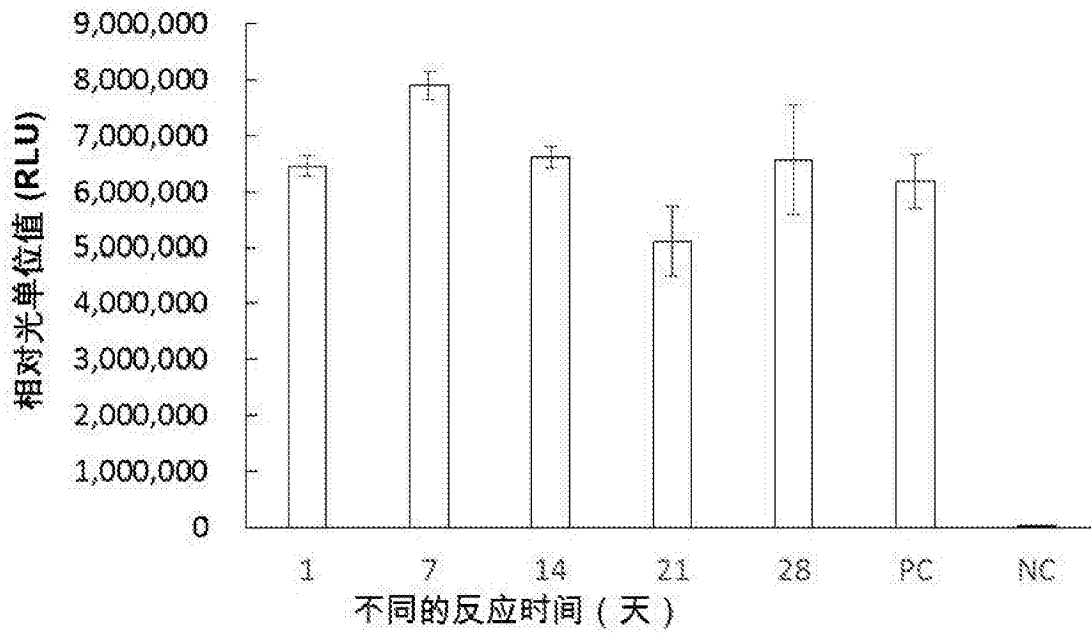


图3

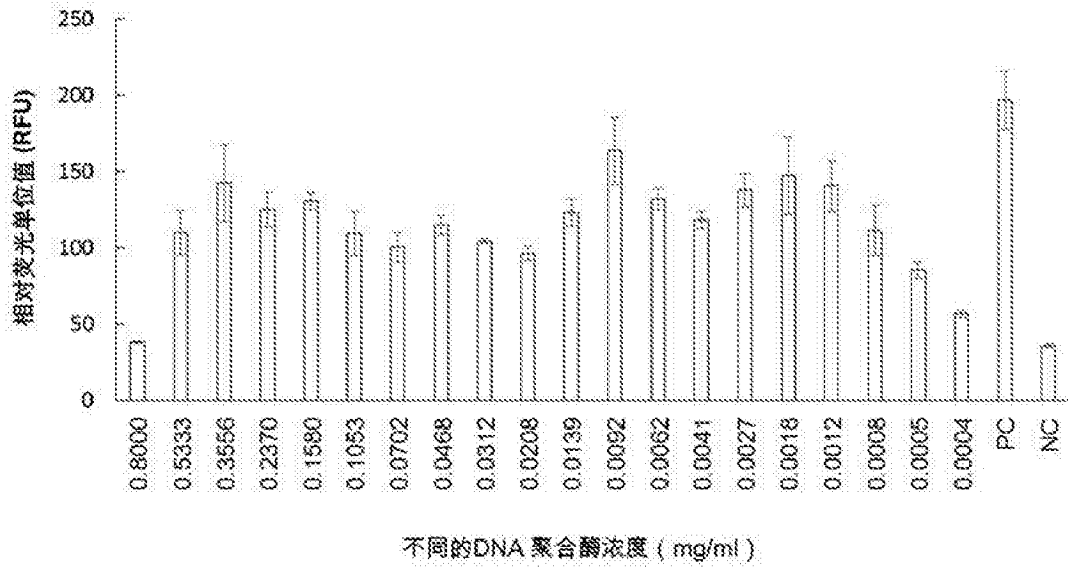


图4

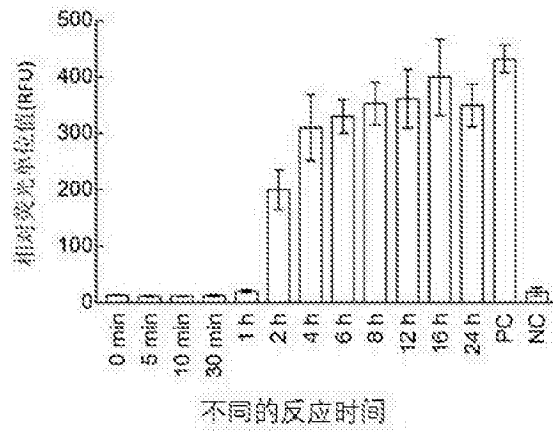


图5

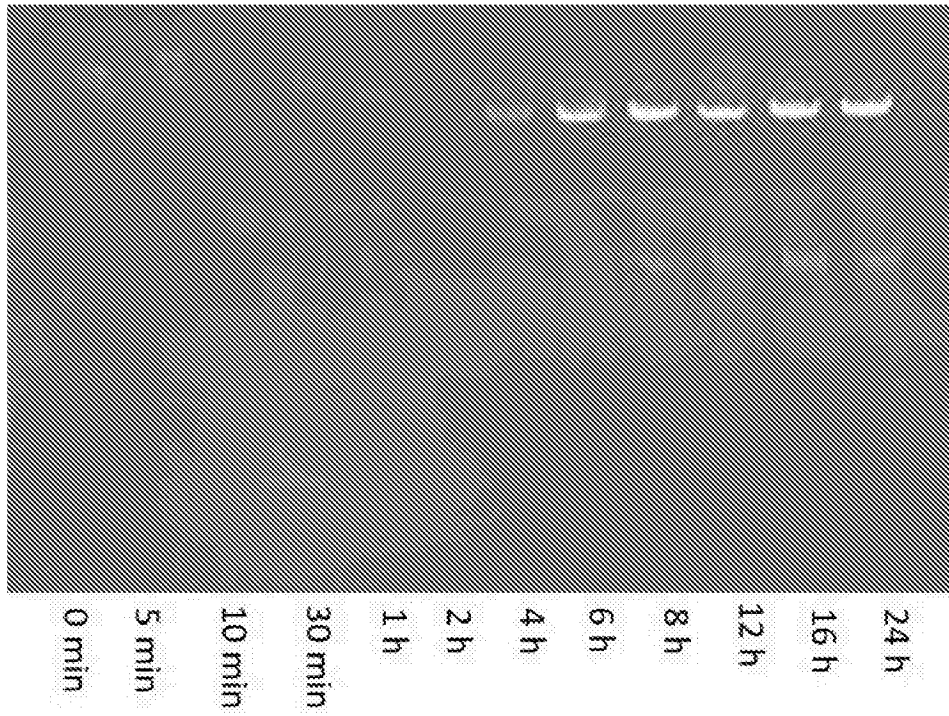


图6

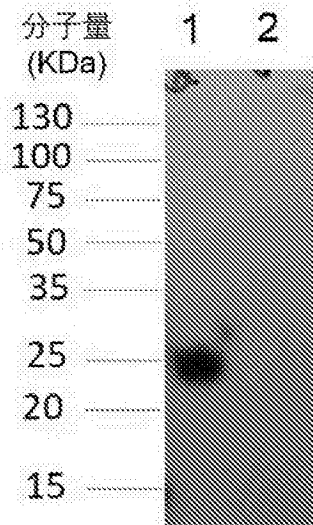


图7

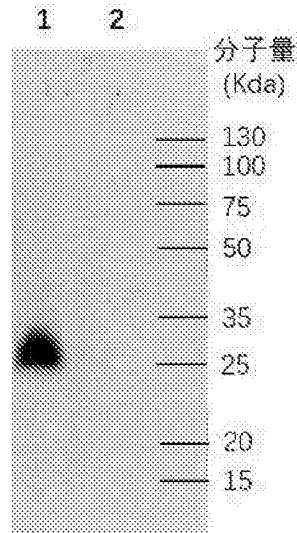


图8

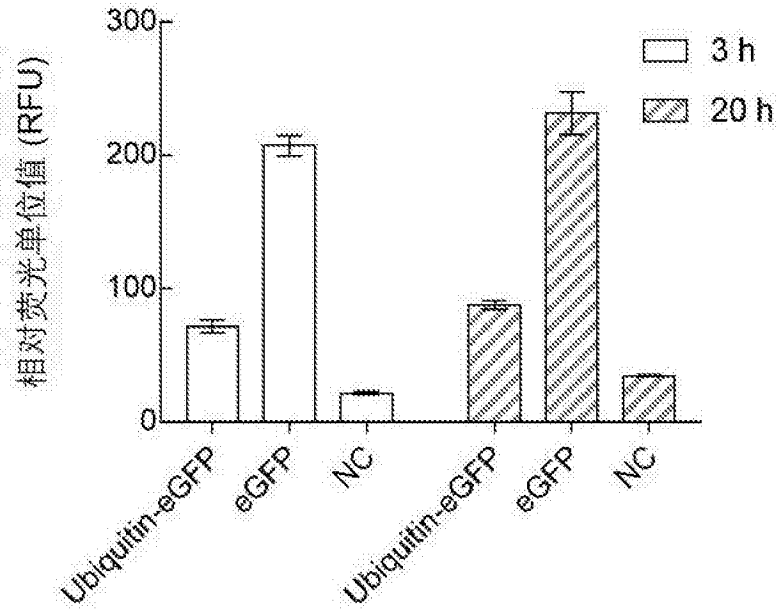


图9

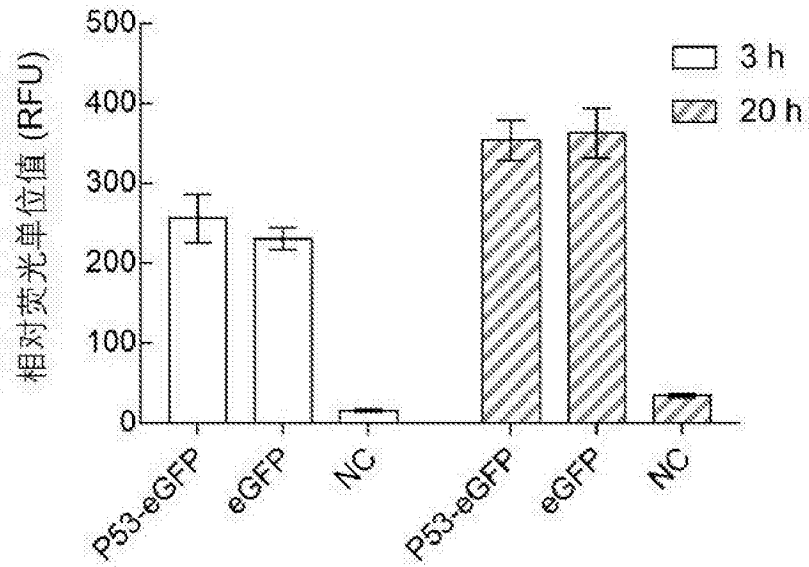


图10

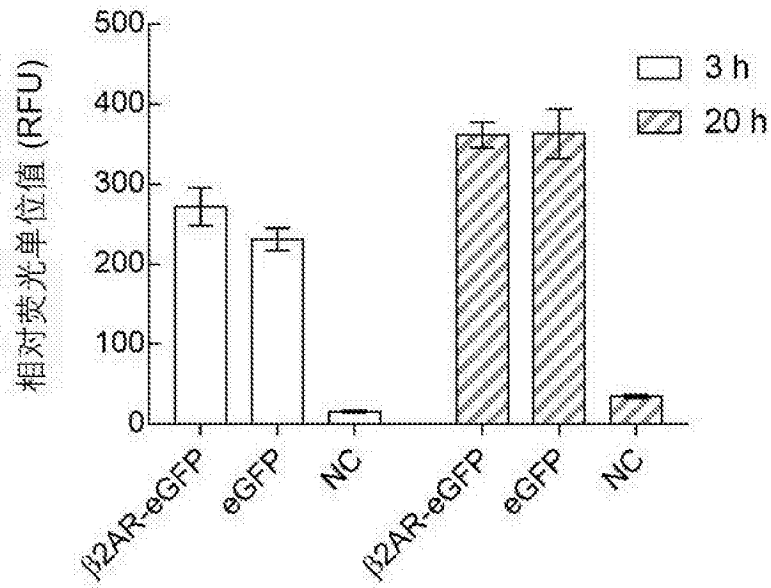


图11

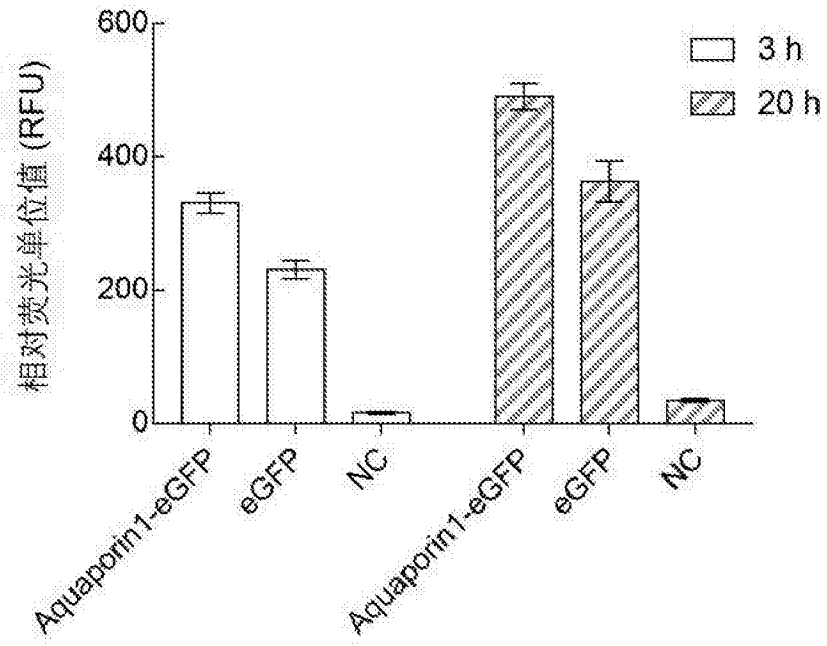


图12

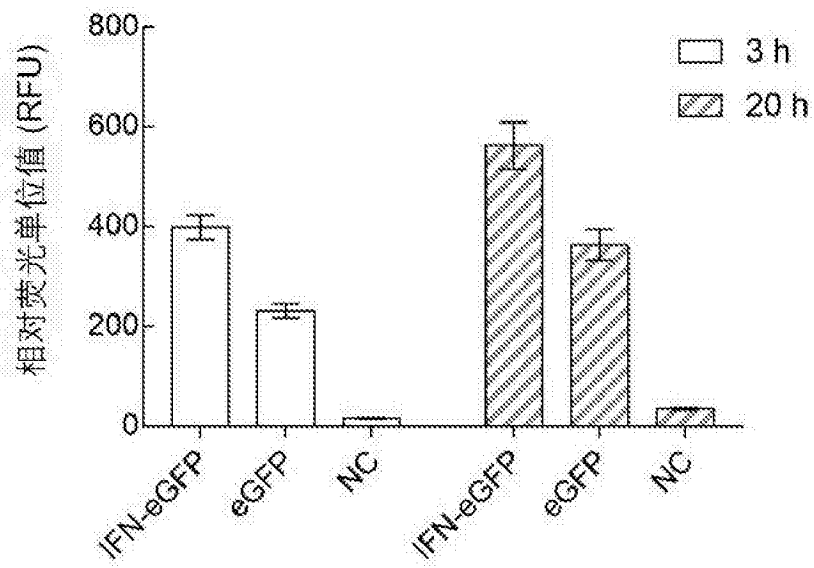


图13

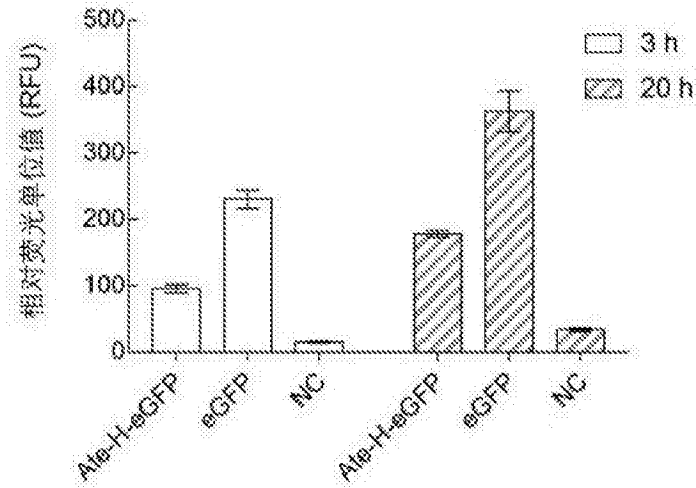


图14

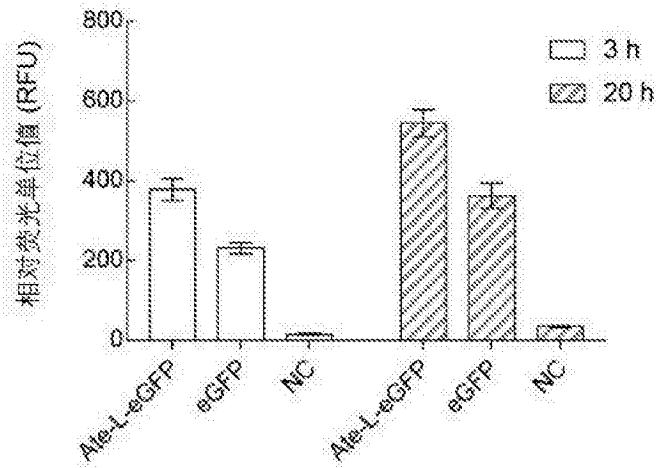


图15

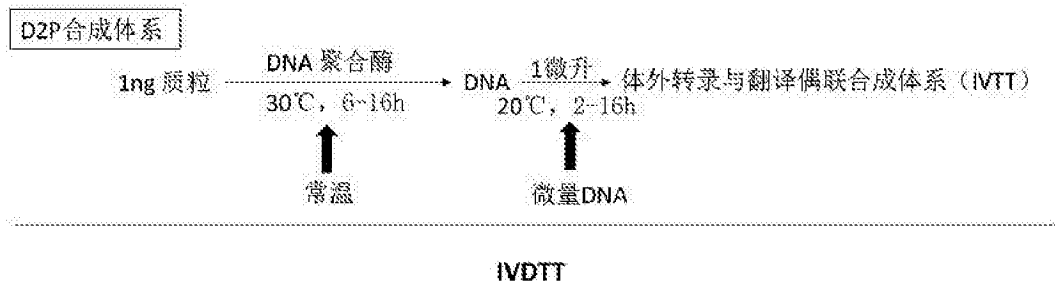


图16