



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109423509 A

(43)申请公布日 2019.03.05

(21)申请号 201810982963.4

(22)申请日 2018.08.27

(66)本国优先权数据

201710746850.X 2017.08.27 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 徐开 雷先德 于雪

(51)Int.Cl.

C12Q 1/54(2006.01)

C12Q 1/66(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图3页

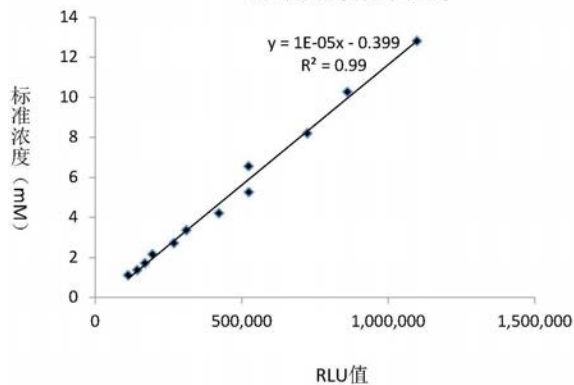
(54)发明名称

一种葡萄糖检测方法、试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种葡萄糖的检测方法,包括以下步骤:(1)制备:制备体外生物合成体系;(2)加样:将待测样品加入步骤(1)所述合成体系;(3)合成:启动目标物的体外生物合成反应;(4)检测:检测所述合成体系中所合成目标物的信号强度;(5)计算:根据步骤(4)所述信号强度按信号强度-葡萄糖浓度关系曲线计算待测样品的葡萄糖浓度或含量。本发明还提供了一种采用本发明第一方面所述检测方法的葡萄糖检测试剂盒,在血糖和尿糖的检测中的应用。与现有技术中的葡萄糖氧化酶电极的方法相比,本发明葡萄糖检测方法具有特异性强、灵敏度高、受外界干扰少以及易于高通量和大数据测量等优势。

葡萄糖浓度标准曲线



1. 一种葡萄糖的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备

制备体外生物合成体系;

(2) 加样

将待测样品加入步骤(1)所述合成体系;

(3) 合成

启动目标物的体外生物合成反应;

(4) 检测

检测所述合成体系中所合成目标物的信号强度;

(5) 计算

根据步骤(4)所述信号强度按信号强度-葡萄糖浓度关系曲线计算待测样品的葡萄糖浓度或含量;

所述信号强度-葡萄糖浓度关系曲线根据已知不同葡萄糖浓度的标准样品替换步骤(2)的待测样品,并经所述步骤(1)~(4)后得到的目标物信号强度进行绘制。

2. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:步骤(1)中所述体外生物合成体系以葡萄糖为能量来源,通过葡萄糖代谢产生ATP。

3. 如权利要求2所述的检测方法,其特征在于:所述葡萄糖来源于待测样品和/或所述合成体系。

4. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:步骤(2)中所述待测样品经预处理。

5. 如权利要求4所述的检测方法,其特征在于:所述预处理包括分离或过滤血细胞和血浆蛋白。

6. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:步骤(1)中所述体外生物合成体系为体外核酸合成体系或体外蛋白合成体系。

7. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:步骤(3)中所述目标物为发光报告蛋白、发光报告核酸,或其组合。

8. 如权利要求7所述的检测方法,其特征在于:所述发光报告蛋白为荧光蛋白或荧光素酶或重组荧光素酶。

9. 如权利要求7所述的检测方法,其特征在于:所述步骤(3)包括在步骤(2)之后加入外源的DNA分子作为模板,用于合成所述报告蛋白或报告核酸,并在合适的温度下混匀反应。

10. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:步骤(4)中所述信号强度为发光强度。

11. 一种采用权利要求1-10任一项所述方法的葡萄糖检测试剂盒,其特征在于,包括以下试剂:

(a) 细胞提取物;

(b) 无或用于合成蛋白质的底物;

(c) 用于合成RNA的底物;

(d) 无或RNA聚合酶;

(e) DNA模板。

12. 如权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,还包括选自下组的一种或多种试剂:

(f1) 镁离子;

- (f2) 钾离子;
- (f3) 缓冲剂;
- (f4) 聚乙二醇;
- (f5) 磷酸盐;
- (f6) 二硫苏糖醇 (DTT);
- (f7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

13. 如权利要求11或12所述的试剂盒,其特征在于:包括一个或多个容器,所述试剂单独或任意多种混合分装在所述容器内。

14. 如权利要求11或12所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂为溶液、冻干粉、或固化体中的一种或任意组合。

15. 权利要求1-10中任一项所述方法或权利要求11-12中任一项所述试剂盒在检测血糖浓度或尿糖浓度中的应用。

## 一种葡萄糖检测方法、试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,涉及一种葡萄糖检测方法、试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 葡萄糖是人体中重要的能量来源,在血液中的浓度受到严密调控。血液中葡萄糖浓度变化,能够反映人体健康状况,尤其是糖尿病患者的身体状况,长时间高血糖或者血糖浓度波动频繁极容易引起各种并发症。一般来说血糖正常值如下:空腹血糖正常值为4.0-6.1mmol/L,正常餐后1小时血糖范围是6.7-9.4毫摩/升两小时血糖范围是3.9-7.8mmol/L。空腹全血血糖 $\geq 6.7$ mmol/L,2次重复测定可诊断为糖尿病。只有当血糖超过一定浓度范围时,糖才能较多地从尿中排出,形成尿糖。所以说,血糖的高低决定着尿糖的有无:在临床检验化验中,血糖在180~200mg/dl,尿糖应为 $\pm$ (正常);血糖在200~250mg/dl,尿糖应为+(阳性,即尿糖偏高)。葡萄糖的准确测定对于诊断和治疗高血糖症和低血糖症十分重要。目前糖尿病病人主要使用葡萄糖脱氢酶(GDH)电极测量法和葡萄糖氧化酶(GOX)电极测量法自己对血糖浓度进行不连续测量,但这两种检测方法存在检测试纸容易受氧气影响,保存时间短,或者容易被血液中其他糖类分子干扰等缺点。此外,其他方法如,皮下微电极连续测量法,近红外光谱检测指甲法,近红外光谱检测耳垂法,以及利用微电流吸取葡萄糖的无创伤皮肤贴片等方法也有报道。但前述方法存在特异性差,准确度低,容易受体液中其他小分子的影响等缺点。因此,开发一种特异性更强,灵敏度更高,不易受外界干扰的葡萄糖检测方法以及易于保存的检测产品成为科学研究领域和临床检测领域的迫切需要。

### 发明内容

[0003] 本发明提供了一种检测葡萄糖浓度或含量的方法。利用本发明的方法,在以葡萄糖作为能量来源的生物合成体系中,通过检测合成的目标物的信号强度来测定样品中葡萄糖浓度或含量。本发明的检测方法具有特异性强、灵敏度高,不易受其他糖类分子干扰的优点。

[0004] 本发明第一方面提供了一种葡萄糖的检测方法,包括以下步骤:(根据权利要求写)

[0005] (1) 制备

[0006] 制备体外生物合成体系;

[0007] (2) 加样

[0008] 将待测样品加入步骤(1)所述合成体系;

[0009] (3) 合成

[0010] 启动目标物的体外生物合成反应;

[0011] (4) 检测

[0012] 检测所述合成体系中所合成目标物的信号强度;

[0013] (5) 计算

[0014] 根据步骤(4)所述信号强度按信号强度-葡萄糖浓度关系曲线计算待测样品的葡萄糖浓度或含量;

[0015] 所述信号强度-葡萄糖浓度关系曲线根据不同已知葡萄糖浓度的标准样品替换步骤(2)的待测样品,并经所述步骤(1)~(4)后得到的目标物信号强度进行绘制。

[0016] 在另一优选例中,所述步骤(1)中所述体外生物合成体系以葡萄糖为能量来源,通过葡萄糖代谢产生ATP。

[0017] 在另一优选例中,所述葡萄糖来源于待测样品和/或合成体系。

[0018] 在另一优选例中,所述步骤(2)中所述待测样品经预处理。

[0019] 在另一优选例中,作为优选,所述预处理包括分离或过滤血细胞和血浆蛋白。

[0020] 在另一优选例中,所述步骤(1)中所述体外生物合成体系为体外核酸合成体系或体外蛋白合成体系。

[0021] 在另一优选例中,所述体外蛋白合成体系为酵母体外蛋白合成体系,优选的,为克鲁维酵母体外蛋白合成体系,更优选的,为乳酸克鲁维酵母体外蛋白合成体系。

[0022] 在另一优选例中,所述步骤(3)中所述目标物为发光报告蛋白、发光报告核酸,或其组合。

[0023] 在另一优选例中,所述发光报告蛋白为荧光蛋白或荧光素酶或重组荧光素酶。

[0024] 在另一优选例中,所述步骤(3)包括在步骤(2)之后加入外源的DNA分子作为模板,用于合成所述报告蛋白或报告核酸,并在合适的温度下混匀反应。

[0025] 在另一优选例中,所述合适的温度根据体外生物合成体系的特点确定,优选为20-37°C,更优选为20-25°C。

[0026] 在另一优选例中,所述步骤(4)中所述信号强度为发光强度。

[0027] 本发明第二方面提供了一种采用本发明第一方面所述检测方法的葡萄糖检测试剂盒,包括以下试剂:

[0028] (a) 细胞提取物;

[0029] (b) 无或用于合成蛋白质的底物;

[0030] (c) 用于合成RNA的底物;

[0031] (d) 无或RNA聚合酶;

[0032] (e) DNA模板。

[0033] 在另一优选例中,本发明第二方面所述试剂盒还包括选自下组的一种或多种试剂:

[0034] (f1) 镁离子;

[0035] (f2) 钾离子;

[0036] (f3) 缓冲剂;

[0037] (f4) 聚乙二醇;

[0038] (f5) 磷酸盐;

[0039] (f6) 二硫苏糖醇(DTT);

[0040] (f7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0041] 在另一优选例中,所述试剂盒包括一个或多个容器,所述试剂单独或任意多种混合分装在所述容器内。

- [0042] 在另一优选例中,所述试剂盒,包括:
- [0043] (k1) 第一容器,以及位于第一容器内的细胞提取物;
- [0044] (k2) 第二容器,以及位于第二容器内的RNA聚合酶;
- [0045] (k3) 第三容器,以及位于第三容器内的DNA模版;
- [0046] (k4) 第四容器,以及位于第四容器内的用于合成RNA的底物;
- [0047] (k5) 第五容器,以及位于第五容器内的用于合成蛋白质的底物;
- [0048] (k6) 第六容器,以及位于第六容器内的磷酸盐;
- [0049] (kt) 标签或说明书。
- [0050] (k7) 第七容器,以及位于第七容器内的镁离子;
- [0051] (k8) 第八容器,以及位于第八容器内的钾离子;
- [0052] (k9) 第九容器,以及位于第九容器内的缓冲剂;
- [0053] (k10) 第十容器,以及位于第十容器内的聚乙二醇等。
- [0054] 在另一优选例中,所述试剂为溶液、冻干粉、或固化体中的一种或任意组合。
- [0055] 在另一优选例中,所述冻干粉由任意多种所述试剂混合后的水溶液冷冻干燥制得。
- [0056] 在另一优选例中,所述细胞提取物来源于原核细胞、真核细胞。
- [0057] 在另一优选例中,所述真核细胞包括高等真核细胞。
- [0058] 在另一优选例中,所述细胞提取物来源于选自下组的细胞:人源细胞(如 Hela细胞)、中国仓鼠卵巢细胞、昆虫细胞、麦胚细胞、兔网织红细胞、酵母细胞、或其组合。
- [0059] 在另一优选例中,所述细胞提取物来源于酵母细胞,所述酵母细胞选自下组的一种或多种来源的酵母:酿酒酵母、毕氏酵母、克鲁维酵母之一或其组合;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。
- [0060] 在另一优选例中,所述细胞提取物为对酵母细胞的水性提取物。
- [0061] 在另一优选例中,所述细胞提取物不含酵母内源性的长链核酸分子。
- [0062] 在另一优选例中,所述的合成RNA的底物包括:核苷单磷酸、核苷三磷酸之一或其组合。
- [0063] 在另一优选例中,所述的合成蛋白质的底物包括:1-20种天然氨基酸、以及非天然氨基酸。
- [0064] 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、谷氨酸镁之一或其组合。
- [0065] 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、谷氨酸钾之一或其组合。
- [0066] 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、三羟甲基氨基甲烷之一或其组合。
- [0067] 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,如PEG200、400、1500、2000、4000、6000、8000、10000等,较佳地,分子量为3000-10000的聚乙二醇。
- [0068] 在另一优选例中,所述聚乙二醇(PEG)选自下组:PEG3000、PEG8000、PEG6000、PEG3350之一或其组合。

[0069] 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。

[0070] 在另一优选例中,所述的DNA模板含有编码报告蛋白或报告核酸(如报告RNA)的序列。

[0071] 在另一优选例中,所述的编码报告蛋白的序列包括基因组序列、cDNA序列。

[0072] 在另一优选例中,所述的编码报告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。

[0073] 在另一优选例中,所述试剂盒包括选自下组的试剂:酵母细胞提取物、聚乙二醇、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、醋酸钾、醋酸镁、核苷三磷酸、氨基酸、二硫苏糖醇(DTT)、T7RNA聚合酶、磷酸钾、DNA模板或其组合。

[0074] 本发明第三方面提供了一种本发明第一方面所述葡萄糖检测方法或本发明第二方面所述试剂盒在检测血糖浓度或尿糖浓度中的应用。

[0075] 本发明提供了一种葡萄糖的检测方法、及采用所述检测方法的试剂盒,可应用于葡萄糖的检测,包括血糖和尿糖的检测。与现有技术中的葡萄糖氧化酶法相比,本发明葡萄糖检测方法具有特异性强、灵敏度高、受外界干扰少以及易于高通量和大数据测量等优势。

[0076] 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。

## 附图说明

[0077] 图1.本发明检测葡萄糖的原理。左侧虚线框中显示的反应过程就是本发明中体外生物合成方法检测葡萄糖的主要的原理。样品中的葡萄糖被体系中一系列的特异性酶利用,最终转化为能够被直接利用的能量分子ATP。

[0078] 图2.本发明发光强度-葡萄糖浓度关系曲线。不同浓度的葡萄糖在体外生物合成体系中产生不同的相对光单位值(relative light unit,RLU)。不同浓度的葡萄糖引起体外生物合成体系中合成不同量的萤火虫荧光素酶(fireflyluciferase,FLUC),在与荧光素底物发生反应后发出不同强度的RLU值,建立发光强度(RLU值)与葡萄糖浓度之间对应关系的关系曲线。

[0079] 图3.本发明发光强度-葡萄糖浓度关系曲线。不同浓度的葡萄糖在体外生物合成体系中产生不同的相对荧光单位值(relative fluorescence unit,RFU)。不同浓度的葡萄糖引起体外生物合成体系中合成不同量的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein,eGFP)的发光强度(RFU值)与葡萄糖浓度之间对应关系的关系曲线。

[0080] 图4.本发明葡萄糖检测方法对于葡萄糖的特异性。使用加入6种单糖的体外生物合成体系与只加入葡萄糖的体外生物合成体系的信号强度进行对比实验,分别设置8个浓度梯度,对比体系的RLU值。Glucose:只含有一定浓度葡萄糖合成体系的RLU值。Mix:含有6种单糖的合成体系的RLU值,其中葡萄糖含量与相应的glucose体系中葡萄糖含量相同。

[0081] 图5.实施例4中本发明用于牛血清血糖浓度检测,并与酶法(葡萄糖氧化酶法)检测结果的对比。

## 具体实施方式

[0082] 经过广泛而深入的研究,通过大量实践和摸索,发明了一种葡萄糖检测方法,用于检测待测样品中的葡萄糖浓度或含量。该方法利用以葡萄糖作为能量来源的体外生物合成体系,以报告蛋白或者报告核酸(如报告RNA)为报告因子,通过检测所合成报告因子的信号强度来检测葡萄糖的浓度。实验表明,应用本发明的方法,在体外蛋白合成体系中,以FLUC作为发光报告蛋白,以发光强度作为报告信号强度,通过测定发光强度来检测人血清样品葡萄糖浓度,误差在2%以内。本发明的方法还具有特异性强、灵敏度高、不易受其他糖类分子干扰等优点。在此基础上,本发明人完成了本发明。

[0083] 利用体外生物合成体系来检测葡萄糖浓度或含量的理论构建

### [0084] 1. 科学背景

[0085] 核苷三磷酸(ATP,CTP,GTP and UTP,NTP)在是细胞内一类重要的小分子,他们是合成RNA的基本构件,作为直接的能量来源广泛参与细胞内重要的生命过程,包括蛋白质的合成[1],细胞内信号的传导[2],以及对生命过程的调节和控制等。其中,在蛋白质合成过程中,ATP参与氨基酸与tRNA连接[3]和蛋白质翻译过程[1],而 GTP则参与了蛋白质翻译的全部过程,包括翻译起始、翻译延伸和翻译终止[1]。

[0086] 目前蛋白质合成方法有两种:细胞内合成和体外无细胞合成。体外无细胞蛋白合成方法是1990年代产生[4-6],以外源的mRNA或DNA为蛋白质合成模板,通过认为控制补加蛋白质合成所需的底物、能量、以及转录和翻译相关蛋白因子等物质,实现目的蛋白质的合成,是一种相对快速、省时、便捷的蛋白质表达方式。ATP和 GTP能够被直接利用,作为初级能量。为了延长合成时间,提高蛋白质产量,一些具有高能磷酸键的物质被用作能量再生物质,这些化合物负责将高能磷酸键转移给 ADP,实现ATP的再生[7]。

[0087] 在体外转录和翻译偶联的体系(in vitro transcription and translation, IVTT)中, RNA的转录和蛋白质的翻译过程都需要NTP(ATP,GTP,CTP,UTP)。由于在IVTT体系中,很多天然细胞通路都已经被破坏,如何持续稳定的提供能量的供应对于蛋白质合成产量和持续时间都至关重要,而且,NTP水解产生的磷酸会抑制体外蛋白质的合成 [8]。目前很多的体外蛋白质合成体系都利用含有高能磷酸键的化合物作为再生能量来源,由对应的酶催化高能磷酸键向ADP的转移,这些化合物常见的有磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate,PEP),肌酸磷酸(creatine phosphate,CrP)和乙酰磷酸(acetyl phosphate)等[7]。但是这些化合物往往只能在开始阶段提供很多能量,不能持久,而且成本都比较高,不利于体外蛋白质合成体系的应用[7]。

[0088] 葡萄糖(glucose)是细胞的重要营养物质,是酵母细胞培养的重要碳源。葡萄糖在酵母细胞内可以被不同的细胞通路利用,包括糖酵解途径(glycolysis pathway)和磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway,PPP)等[9]。这些通路产生的各种中间产物以及最终的产物也参与非常多的细胞内进程。糖酵解产生的丙酮酸可以参与线粒体内的三羧酸循环,生成二氧化碳和水,以及大量的ATP[10]。糖酵解和磷酸戊糖途径产生的还原性分子NADH和NADPH参与酵母细胞内氧化应激过程[9]。

### [0089] 2. 基本原理

[0090] 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces*

lactis)能够通过发酵途径和呼吸途径代谢葡萄糖。酿酒酵母是Crabtree阳性细胞,主要以发酵途径进行葡萄糖的代谢。乳酸克鲁维酵母不同于酿酒酵母,是Crabtree阴性细胞,主要以呼吸途径进行葡萄糖的代谢[11]。在乳酸克鲁维酵母细胞内,糖酵解途径位于呼吸途径和发酵途径的上游,糖酵解产生的丙酮酸进入下游呼吸产生二氧化碳和水,进入发酵途径产生乙醇。

[0091] 通过糖酵解途径,一分子的葡萄糖被一系列酶催化产生两分子的丙酮酸盐和两分子的ATP。与其他真核细胞相同,乳酸克鲁维酵母细胞糖酵解途径发生在细胞质内,催化从葡萄糖到丙酮酸过程的12类酶位于细胞质内,而且这些酶在细胞内的浓度都比较高[12]。乳酸克鲁维酵母细胞提取液中含有这些糖酵解途径所需的酶,所以葡萄糖可以作为酵母体外蛋白质合成体系的再生能量来源。通过糖酵解途径,葡萄糖可以比较缓慢的释放能量,维持反应体系中ATP相对稳定的水平。在大肠杆菌和酿酒酵母体外蛋白质合成体系中,葡萄糖已经被证实能够用作再生能量来源,而且都能够一定程度上提高合成的蛋白质的产量[7, 13]。

[0092] 在体外生物合成体系中,加入不同浓度的葡萄糖,通过糖酵解途径会产生不同量的ATP,进而影响目的蛋白和/或者目的RNA的合成产量[7]。如果以报告蛋白(或报告RNA)为报告因子,如绿色荧光蛋白和萤火虫荧光素酶等,通过合成的不同数量的报告蛋白产生的荧光强度的差异,能够反映出最初加入的葡萄糖的浓度差异,参阅图1。如此,体外生物合成体系配合报告蛋白(或报告RNA)就能够定量的某些样品中葡萄糖的浓度,如糖尿病人的血糖浓度等。

[0093] 在糖酵解途径中,从葡萄糖到生物合成需要的ATP,需要经过10步反应,参与催化的酶达到12类。经过这一系列的酶催化反应,能够排除其他糖类对于体外生物合成体系的影响,最终荧光信号的差异只会反映待检样品中葡萄糖的浓度,极大的提高了特异性。

[0094] 利用体外生物合成体系检测葡萄糖,整个过程基本都是在流动相或者准流动相中进行,而且空气中的任何成分均不是必需的,可以通过微流控等技术隔绝空气,减少空气等外界条件对检测体系的影响,进一步提高反应的灵敏度和准确度。

[0095] 3. 技术架构

[0096] 葡萄糖浓度监测技术的实现包括:生物合成技术。

[0097] 酵母因多种技术优点被实验室和工业界广泛用于重组蛋白的表达,其中包括较高的蛋白质产量、成本低、生长速度快、高细胞密度培养以及高安全性等。目前已知超过100多种重组蛋白在酵母细胞中成功被表达[14]。

[0098] 经过优化体外生物合成体系能够高效的合成目的蛋白和/或者目的RNA。具体的,用优化过的生物合成体系,所合成的增强型绿色荧光蛋白活性的相对荧光单位值相对较高并且非常灵敏,极具可检测性。利用生物合成荧光蛋白,报告蛋白产量更高,荧光信号更强,线性响应范围更广,使检测葡萄糖浓度具有更高的灵敏度和准确度。

[0099] 综上所述,构建基于体外生物合成的方法检测葡萄糖浓度的体系,实现样品中葡萄糖浓度高效、灵敏、准确、特异性检测,理论上是可行的。

[0100] 细胞提取物

[0101] 在一优选实施方式中,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。

[0102] 在一优选实施方式中,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、昆虫细胞、或其组合。

[0103] 在一优选实施方式中,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。

[0104] 在本发明中,所述细胞提取物为对酵母细胞的水性提取物。

[0105] 在本发明中,所述细胞提取物不含酵母内源性的长链核酸分子。

[0106] 在本发明中,所述细胞提取物的含量和纯度没有特别限制。

[0107] 在一优选实施方式中,所述试剂盒中,所述细胞提取物(如酵母细胞提取物)的含量(wt%)为10%—95%,较佳地,20%—80%,更佳地,40%—60%,以所述试剂盒包括的所有试剂的总重量计。

[0108] 在本发明中,所述的细胞提取物不含完整的细胞,典型的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,细胞提取物中还含有一些源自细胞的细胞质中的其他蛋白,尤其是可溶性蛋白。

[0109] 在本发明中,所述的细胞提取物所含蛋白含量为10-100mg/mL,较佳地为 20-80mg/mL。所述的测定蛋白含量方法为考马斯亮蓝测定方法。

[0110] 在本发明中,所述的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:

[0111] (i) 提供细胞;

[0112] (ii) 对细胞进行洗涤处理,获得经洗涤的细胞;

[0113] (iii) 对经洗涤的细胞进行细胞破碎处理,从而获得细胞粗提物;

[0114] (iv) 对所述细胞粗提物进行固液分离,获得液体部分,即为细胞提取物。

[0115] 在本发明中,所述的固液分离方式不受特别限制,优选为离心。

[0116] 在本发明中,所述离心条件不受特别限制,离心条件为5000-100000g,较佳地,8000-30000g。

[0117] 在本发明中,所述离心时间不受特别限制,离心时间为0.5min-2h,较佳地,20min-50min。

[0118] 在本发明中,所述离心的温度不受特别限制,优选的,离心在1-10°C下进行,较佳地,在2-6°C下进行。

[0119] 在本发明中,所述的洗涤处理方式不受特别限制,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。

[0120] 在本发明中,所述细胞破碎处理的方式不受特别限制,优选的细胞破碎处理包括高压破碎、冻融(如液氮低温)破碎。

[0121] 体外核酸合成体系

[0122] 在本实施方式中,所述体外核酸合成体系包括以下组分:

[0123] (a) 细胞提取物;

[0124] (b) 用于合成RNA的底物;

[0125] (b) 无或RNA聚合酶。

[0126] 在本发明中,所述体外蛋白合成体系还包括选自下组的一种或多种组分:

[0127] (f1) 镁离子;

[0128] (f2) 钾离子;

[0129] (f3) 缓冲剂;

[0130] (f4) 聚乙二醇;

[0131] (f5) 磷酸盐;

[0132] (f6) 二硫苏糖醇(DTT);

[0133] (f7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0134] 在本发明中,所述细胞提取物在体外核酸合成体系中的比例不受特别限制,通常所述细胞提取物的含量(wt%)为10%—95%,较佳地,20%—80%,更佳地,40%—60%,以所述体外核酸白合成体系的总重量计。

[0135] 在本发明中,所述的合成RNA的底物包括:核苷单磷酸、核苷三磷酸之一或其组合。

[0136] 所述核苷三磷酸包括腺嘌呤核苷三磷酸、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0.5-5mM,较佳地为1.0-2.0mM。

[0137] 体外蛋白合成体系

[0138] 蛋白质合成是指生物按照从脱氧核糖核酸(DNA)转录得到的信使核糖核酸(mRNA)上的遗传信息合成蛋白质的过程,如图1所示。蛋白质生物合成亦称为翻译(Translation),即把mRNA分子中碱基排列顺序转变为蛋白质或多肽链中的氨基酸排列顺序过程。这是基因表达的第二步,产生基因产物蛋白质的最后阶段。不同的组织细胞具有不同的生理功能,是因为它们表达不同的基因,产生具有特殊功能的蛋白质,参与蛋白质生物合成的成份至少有200种,其主要体是由mRNA、tRNA、核糖核蛋白体以及有关的酶和蛋白质因子共同组成。

[0139] 体外蛋白合成系统一般是指在细菌、真菌、植物细胞或动物细胞的裂解体系中,加入mRNA或者DNA模板、RNA聚合酶及氨基酸和ATP等组分,完成外源蛋白的快速高效翻译。目前,经常实验的商业化体外蛋白表达系统包括大肠杆菌系统(*E.coli* extract, ECE)、兔网织红细胞(Rabbit reticulocyte lysate, RRL)、麦胚(Wheat germ extract, WGE)、昆虫(Insect cell extract, ICE)和人源系统。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 在本发明中,体外蛋白合成体系不受特别限制,一种优选的体外蛋白质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)。

[0143] 在本发明中,所述体外蛋白合成体系包括以下组分:

[0144] (a) 细胞提取物;

[0145] (b) 用于合成蛋白质的底物;

[0146] (c) 用于合成RNA的底物;

[0147] (d) RNA聚合酶。

[0148] 在本发明中,所述体外蛋白合成体系还包括选自下组的一种或多种组分:

[0149] (f1) 镁离子;

[0150] (f2) 钾离子;

[0151] (f3) 缓冲剂;

[0152] (f4) 聚乙二醇;

[0153] (f5) 磷酸盐;

[0154] (f6) 二硫苏糖醇(DTT);

[0155] (f7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0156] 在本发明中,所述细胞提取物在体外蛋白合成体系中的比例不受特别限制,通常所述细胞提取物的含量(wt%)为10%—95%,较佳地,20%—80%,更佳地,40%—60%,以所述体外蛋白合成体系的总重量计。

[0157] 在本发明中,所述的合成RNA的底物包括:核苷单磷酸、核苷三磷酸之一或其组合。

[0158] 所述核苷三磷酸包括腺嘌呤核苷三磷酸、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0.5-5mM,较佳地为1.0-2.0mM。

[0159] 所述合成蛋白质的底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0.01-0.5mM,较佳地0.02-0.2mM,如0.05、0.06、0.07、0.08mM。

[0160] 在优选例中,所述体外蛋白合成体系含有聚乙二醇(PEG)或其类似物。聚乙二醇或其类似物的浓度没有特别限制,通常,聚乙二醇或其类似物的浓度(w/v)为0.1-8%,较佳地,0.5-4%,更佳地,1-2%,以所述蛋白合成体系的总重量计。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)。

[0161] 在优选例中,所述体外蛋白合成体系含有缓冲剂,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1-200mM或1-100mM,较佳地,5-50mM。

[0162] 在本发明中,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、谷氨酸镁之一或其组合。

[0163] 在本发明中,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、谷氨酸钾之一或其组合。

[0164] 在本发明中,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。

[0165] 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T7RNA聚合酶。

[0166] 在本发明中, 所述体外蛋白合成体系包括选自下组的试剂: 酵母细胞提取物、聚乙二醇、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、醋酸钾、醋酸镁、核苷三磷酸、氨基酸、二硫苏糖醇 (DTT)、T7RNA聚合酶、磷酸钾或其组合。

[0167] 一种特别优选的体外蛋白质合成体系, 除了细胞提取物, 还含有选自下组的一种或多种或全部成分: 22mM, pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 30-150mM 醋酸钾, 1.0-5.0mM醋酸镁, 1.5-4mM核苷三磷酸混合物, 0.08-0.24mM的氨基酸混合物, 1.7mM二硫苏糖醇, 0.027-0.054mg/mL T7 RNA聚合酶, 1%-10%聚乙二醇, 10-60mM磷酸钾。

[0168] 外源DNA分子 (DNA模板)

[0169] 如本文所用, 术语“外源DNA分子”与“DNA模板”可互换使用, 均指外源的用于指导报告蛋白或报告核酸 (如报告RNA) 合成的DNA分子。通常, 所述的DNA分子为线性的或环状的。所述的DNA分子含有编码报告蛋白或报告核酸 (如报告RNA) 的序列。在本发明中, 所述的编码报告蛋白的序列的例子包括 (但并不限于): 基因组序列、cDNA序列。所述的编码报告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。

[0170] 在本发明中, 所述外源DNA分子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。

[0171] 外源DNA分子还可以选自下组: 编码 $\alpha$ -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 $\alpha$ A、白细胞介素-1 $\beta$ 、溶菌酶素、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。

[0172] 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 $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -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。

[0173] 试剂盒

[0174] 本发明第二方面提供了一种采用第一方面所述检测方法的葡萄糖检测的试剂盒, 包括以下试剂:

[0175] (a) 细胞提取物;

[0176] (b) 无或用于合成蛋白质的底物;

[0177] (c) 用于合成RNA的底物;

[0178] (d) 无或RNA聚合酶;

[0179] (e) DNA模板。

[0180] 本发明中, 所述试剂盒还包括选自下组的一种或多种试剂:

[0181] (f1) 镁离子;

[0182] (f2) 钾离子;

- [0183] (f3) 缓冲剂;
- [0184] (f4) 聚乙二醇;
- [0185] (f5) 磷酸盐;
- [0186] (f6) 二硫苏糖醇 (DTT);
- [0187] (f7) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。
- [0188] 本发明中,所述试剂盒包括一个或多个容器,所述试剂单独或任意多种混合分装在所述容器内。
- [0189] 本发明中,所述试剂为溶液、冻干粉、或固化体中的一种或任意组合。
- [0190] 一种特别优选的检测葡萄糖的试剂盒包括选自下组的一种或多种或全部成分:细胞提取物,聚乙二醇,磷酸钾,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,二硫苏糖醇(DTT),T7RNA聚合酶,荧光素与萤光素酶DNA或者绿色荧光蛋白DNA等。
- [0191] 用于检测葡萄糖浓度的便携试剂盒
- [0192] 作为一种具体实施方式,本发明提供了一种用于葡萄糖浓度检测的试剂盒,包括:
- [0193] (k1) 第一容器,以及位于第一容器内的细胞提取物;
- [0194] (k2) 第二容器,以及位于第二容器内的RNA聚合酶;
- [0195] (k3) 第三容器,以及位于第三容器内的DNA模版;
- [0196] (k4) 第四容器,以及位于第四容器内的用于合成RNA的底物;
- [0197] (k5) 第五容器,以及位于第五容器内的用于合成蛋白质的底物;
- [0198] (k6) 第六容器,以及位于第六容器内的磷酸盐;
- [0199] (kt) 标签或说明书。
- [0200] (k7) 第七容器,以及位于第七容器内的镁离子;
- [0201] (k8) 第八容器,以及位于第八容器内的钾离子;
- [0202] (k9) 第九容器,以及位于第九容器内的缓冲剂;
- [0203] (k10) 第十容器,以及位于第十容器内的聚乙二醇等。
- [0204] 在一优选实施方式中,所述的第一容器和第二容器是同一容器或不同容器。
- [0205] 一种特别优选的用于葡萄糖检测的的试剂盒包含一个体外生物合成体系,包括:细胞提取物,三羟甲基氨基甲烷,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),尿嘧啶核苷三磷酸(UTP),氨基酸混合物,二硫苏糖醇(DTT),RNA酶抑制剂,荧光素和萤光素酶DNA或绿色荧光蛋白DNA,T7RNA聚合酶,聚乙二醇等。
- [0206] 本发明的主要优点在于:
- [0207] 1) 首次开发出一种基于以葡萄糖作为能量来源的体外生物合成体系的葡萄糖检测方法及其试剂盒。
- [0208] 2) 本发明通过体外生物合成体系消耗葡萄糖而供能,提高了葡萄糖检测的特异性,排除其他糖类分子的干扰。
- [0209] 3) 本发明利用高效的体外生物合成体系合成高产量报告RNA和/或报告蛋白,反应具有多步放大效应,具有更高的灵敏度,增加葡萄糖浓度测定的精确性,减少反应体系的体

积,减少样品体积的需求量。

[0210] 4) 本发明所有过程均在液相或准液相中进行,而且空气不是必需的,可以减少空气中的组分对葡萄糖检测的影响。

[0211] 5) 本发明的试剂盒可以用于待测样品的葡萄糖浓度或含量的测定,比现有方法具有特异性强,灵敏度高等优点。

[0212] 6) 本发明的试剂盒可以使用生物合成体系的冻干粉,运输便利,储存时间长,不容易被空气组分影响。

[0213] 7) 本发明的试剂盒可以用于较高通量的检测,提高检测速度与准确性。

[0214] 8) 本发明的检测方法和试剂盒光信号强,灵敏度高,需要的反应体系体积比较小,每次测量成本低。

[0215] 9) 本发明的检测方法和试剂盒基于体外生物合成方法,参与生物合成过程的因子非常多,很多其他的因子的浓度与健康 and 疾病诊断息息相关,也可以用类似的办法进行测量。所以本发明的葡萄糖检测很容易与其他因子的测量合并测量。

[0216] 10) 本发明的检测方法和试剂盒更容易进行高通量的测量,收集大数据量,对单个病人以及人群中疾病发展进行分析。

[0217] 11) 本发明的检测方法和试剂盒更容易与其他相关的检测系统整合,检测其他代谢等生物信号,平行地收集多种类型的生物数据,对单个疾病以及人群中多种疾病发展进行分析。

[0218] 12) 本发明的检测方法和试剂盒测量合成的生物大分子的光度强、特异性高、线性范围广、是对血糖的直接测量,不再需要使用其他方法进行校正,减少操作次数,提高病人测量积极性。

[0219] 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并不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。

[0220] 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。

[0221] 实施例1: 本发明发光强度-葡萄糖浓度标准曲线的确定

[0222] 1.1 提供或制备一体外蛋白合成体系;

[0223] 1.2 将不同浓度的葡萄糖(1.1-12.8mM)加入到体外蛋白合成体系中,作为该体系合成报告蛋白的能量来源;

[0224] 1.3 在室温(20-25℃)条件下,孵育上述体外蛋白合成体系约30min,经检测体系中葡萄糖已全部反应完毕;

[0225] 1.4 在96孔白板或384孔白板中加入等体积的底物荧光素(luciferine)及上述反应样品,并立即放置于Envision 2120多功能酶标仪(Perkin Elmer),读数,检测萤火虫荧光素酶活性,相对光单位值(RLU)作为活性单位;

[0226] 1.5 把葡萄糖浓度作为横坐标,RLU值作为纵坐标,将葡萄糖浓度和其对应的 RLU 值在坐标系中标识出来,然后绘制相应的标准曲线,参阅图2。

[0227] 实验结果:

[0228] 图2显示随着RLU值的增大,葡萄糖浓度会相应增大,并且呈现线性变化趋势,RLU值最高时所对应葡萄糖浓度最高,具体可参阅下表。

	RLU 值 (x)	标准浓度 (y)	y 与 x 关系式
	1098211.33	12.80	$y=1E-05x-0.399$ $R^2=0.99$
	861004.67	10.25	
	723786.67	8.20	
	523568.33	6.55	
	524544.00	5.25	
[0229]	422623.00	4.20	
	310888.67	3.35	
	268984.00	2.70	
	195680.33	2.15	
	170079.67	1.70	
	143013.00	1.35	
	112637.67	1.10	
	89328.67	0	

[0230] 本实施例获得的所述信号强度-葡萄糖浓度关系曲线的拟合而成的葡萄糖浓度或含量的计算式为,

[0231] 葡萄糖浓度计算式:

[0232]  $y=1E-05x-0.399, R^2=0.99$

[0233] 式中y为待测样品的葡萄糖浓度,x为发光强度值;

[0234] 葡萄糖含量计算式:

[0235]  $Y=(1E-05x-0.399)*V, R^2=0.99$

[0236] 式中Y为待测样品的葡萄糖含量,x为发光强度(RLU)值,V为待测样品体积。

[0237] 实施例2:本发明发光强度-葡萄糖浓度标准曲线的确定

[0238] 作为另一实施例,将实施例1所述报告蛋白替换为GFP或eGFP。

[0239] 2.1将不同浓度的葡萄糖(0-15mM)加入到体外生物合成体系中,作为该体系合成报告蛋白eGFP的能量来源;

[0240] 2.2在室温(20-25℃)条件下,孵育上述生物合成光体系约30min,采用Envision 2120多功能酶标仪(Perkin Elmer)测量合成的eGFP,发出的相对荧光强度值(relative fluorescence unit,RFU);

[0241] 2.3把RFU值作为横坐标,葡萄糖浓度作为纵坐标,将荧光强度RFU值和其对应的葡萄糖浓度在坐标系中标识出来,绘制相应的标准曲线,具体可参阅图3。

[0242] 实验结果:

[0243] 由图3可得知,随着发光强度eGFP值的增大,葡萄糖浓度会相应增大,并且呈现线性变化趋势,eGFP值最高时所对应葡萄糖浓度最高。本实施例获得的所述信号强度-葡萄糖浓度关系曲线的拟合而成的葡萄糖浓度或含量的计算式为,

[0244] 葡萄糖浓度计算式:

[0245]  $y=3E-07x+0.747, R^2=0.98$

[0246] 式中y为待测样品的葡萄糖浓度,x为发光强度(eGFP)值;

[0247] 葡萄糖含量计算式:

$$[0248] Y = (3E-07x + 0.747) * V, R^2 = 0.98$$

[0249] 式中Y为待测样品的葡萄糖含量,x为发光强度(eGFP)值,V为待测样品体积。

[0250] 实施例3:本发明的葡萄糖检测方法用于检测葡萄糖的特异性验证

[0251] 3.1提供一体外蛋白合成体系;

[0252] 3.2选取6种血液中单糖(分别为葡萄糖、甘露糖、葡萄糖胺、半乳糖、木糖和岩藻糖)按照血液中各成分比例[15]配制混合溶液,与葡萄糖纯溶液分别加入体外生物合成体系,并检测合成蛋白的信号强度。分别设置8个浓度梯度(25 mM-5.25mM,依次按等比80%递降),每一个浓度下的合成体系中,加入混合糖的合成体系中的葡萄糖浓度与加入纯葡萄糖的合成体系中葡萄糖浓度相同;

[0253] 3.2将上述反应体系在室温(20-25℃)条件下孵育30min后读取RLU值;

[0254] 实验结果:

[0255] 具体结果参阅图4,从图中可以看出,6种单糖(即甘露糖、葡萄糖胺、葡萄糖、半乳糖、木糖和岩藻糖)的混合溶液和纯葡萄糖溶液相比,RLU值基本一致;对于浓度梯度变化时,两者的变化趋势也是基本一致,都是随着浓度的增大而呈现RLU值的相应增大;由此说明,本发明方法对于葡萄糖检测具有特异性,不受其他单糖(甘露糖、葡萄糖胺、半乳糖、木糖和岩藻糖)成分的影响。

[0256] 实施例4:本发明用于血清血糖浓度检测

[0257] 购买或获取已知葡萄糖浓度的商品牛血清(FBS)作为标准样品,分别采用传统酶法(葡萄糖氧化酶法)的生物传感自动分析仪检测葡萄糖浓度和本发明方法检测葡萄糖浓度(体外生物合成体系反应液通过PerkinElmer Multilabel Reader检测RLU),目的在于:a、验证本发明发光强度-葡萄糖浓度的相关性,b、验证准确度。请参见图5。

[0258] 实验结果:

[0259] 通过传统酶法测定的样品浓度为3.1mM,相比标准值略微偏高,存在一定的误差。使用本发明方法测得的牛血清样品的发光强度RLU值为20605.33,将该测定值代入实施例1所述的发光强度-葡萄糖浓度关系式,计算得到样品血清的浓度值为2.81mM,与标准浓度3.0mM相比,测定值略微偏低,误差率为6.33%。由此说明,本发明方法准确度较高,虽然存在一定的误差,但所述误差范围是合理的、可接受的。同时,也说明了本发明方法的发光强度-葡萄糖浓度相关性好,适用于实际血液或血清样品的葡萄糖检测。

[0260] 实施例5:本发明用于血液血糖浓度检测

[0261] 获取某成人餐后2小时的静脉血液样品3份,经低温离心处理,分离获得上清液作为待测血清样品,分别采用传统酶法(葡萄糖氧化酶法)的生物传感自动分析仪检测葡萄糖浓度和本发明方法检测葡萄糖浓度(体外生物合成体系反应液通过PerkinElmer Multilabel Reader检测RLU值)。

[0262] 实验结果:

[0263] 将测定结果发光强度(RLU值为991611.6)代入实施例1所获得的标准曲线,即 $X = 991611.6$ ,计算得到相应y值(血液葡萄糖浓度),即:

$$[0264] \text{血液葡萄糖浓度} y = 1E-05x - 0.399, R^2 = 0.99$$

[0265] 式中y为待测样品的葡萄糖浓度,x为发光强度值;

[0266] 检测结果表明通过传统酶法(葡萄糖氧化酶法)测定的样品浓度为9.39mM,使用本发明方法测得的成人血清样品的发光强度RLU值为991611.6,将该测定值代入实施例1所述的发光强度-葡萄糖浓度关系式,计算得到样品血清的浓度值为9.51mM,与传统酶法(葡萄糖氧化酶法)相比,本法测定值与酶法测定值基本一致,略微偏高0.12mM,相对偏差约为1.3%。由此说明,本发明方法准确度较高,适用于实际血液或血清样品的葡萄糖检测。

[0267] 上述实验结果表明:与目前使用葡萄糖脱氢酶和葡萄糖氧化酶电极法相比,本发明的利用生物合成体系检测葡萄糖浓度的方法,具有特异性强、灵敏度高、不易受外界影响、和容易高通量使用等优点。

[0268] 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。

[0269] 参考文献:

[0270] 1.Dever,T.E.,et al.Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.Genetics.2016,203,65-107

[0271] 2.Husted,A.S.,et al.GPCR-Mediated Signaling of Metabolites.Cell metabolism 2017,25,777-796

[0272] 3.Guo,M.,and Schimmel,P.Essential nontranslational functions of tRNA synthetases.Nature chemical biology 2013,9,145-153

[0273] 4.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.

[0274] 5.Katzen,F.,et al.The past,present and future of cell-free protein synthesis. Trends in biotechnology.2005,23,150-156.

[0275] 6.Endo Y.,et al.Cell-Free Protein Production:Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.2010,607.

[0276] 7.Anderson,M.J.,et al.Energizing eukaryotic cell-free protein synthesis with glucose metabolism.FEBS letters 2015,589,1723-1727

[0277] 8.Schoborg,J.A.,et al.Substrate replenishment and byproduct removal improve yeast cell-free protein synthesis.Biotechnology journal 2014,9,630-640

[0278] 9.Gonzalez-Siso,M.I.,et al.Sugar metabolism,redox balance and oxidative stress response in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*.Microbial cell factories 2009,8, 46

[0279] 10.Barnett,J.A.A history of research on yeasts 6:the main respiratory pathway. Yeast 2003,20,1015-1044

[0280] 11.Gonzalez-Siso,M.I.,et al.Improved bioethanol production in an engineered *Kluyveromyces lactis* strain shifted from respiratory to fermentative metabolism by deletion of NDI1.Microbial biotechnology 2015,8,

319-330

[0281] 12. Fraenkel, D.G. The top genes: on the distance from transcript to function in yeast glycolysis. *Current opinion in microbiology* 2003, 6, 198-201

[0282] 13. Calhoun, K.A., and Swartz, J.R. Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnology and bioengineering* 2005, 90, 606-613

[0283] 14. Spohner, S.C., et al. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of biotechnology*. 2016, 222, 104-116

[0284] 15. 赵岱, 张丽娟. 新型糖指纹血液标志物在眩晕病人诊断中的初步研究. *临床医学*. 2017, 41, 32

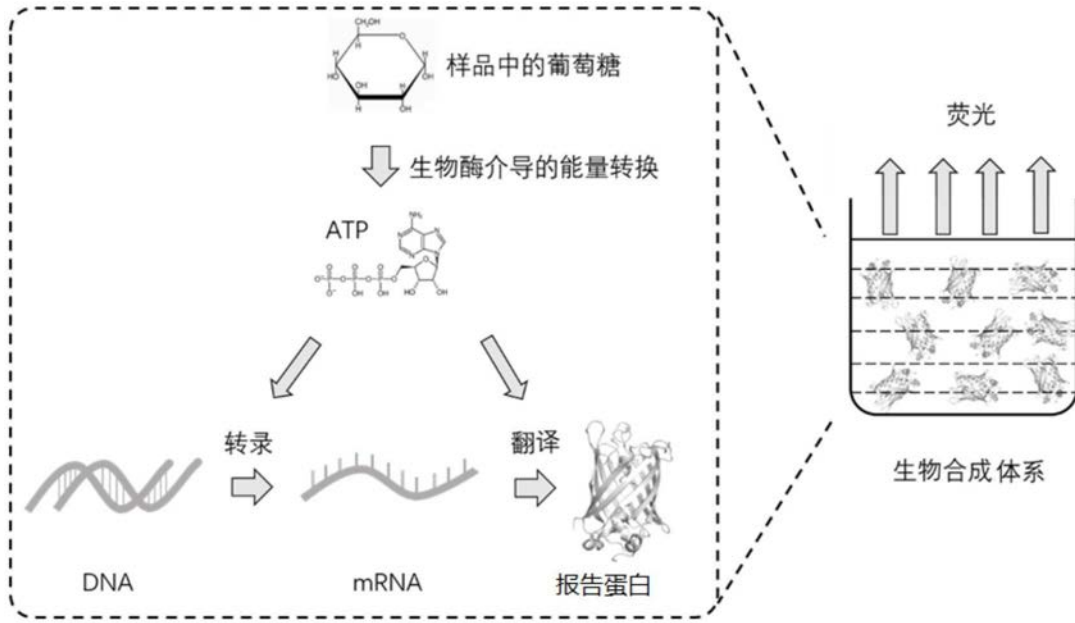


图1

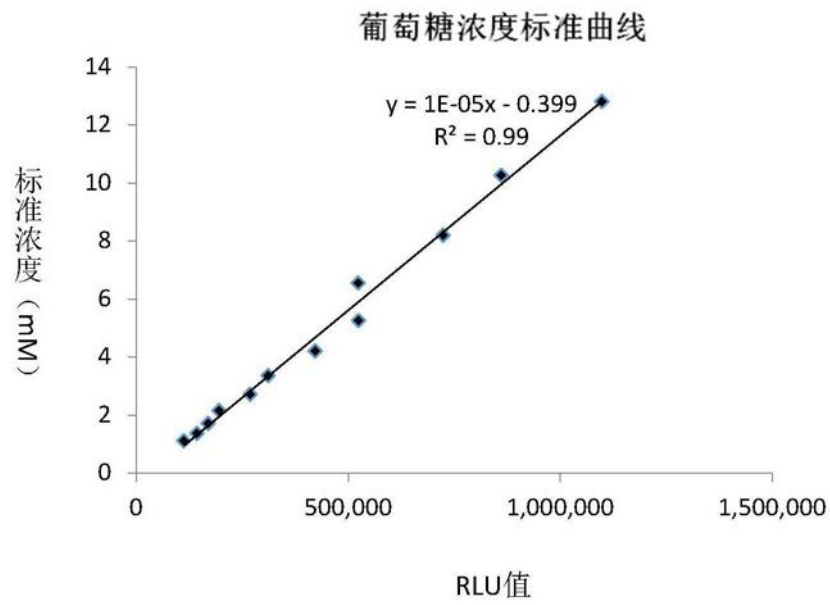


图2

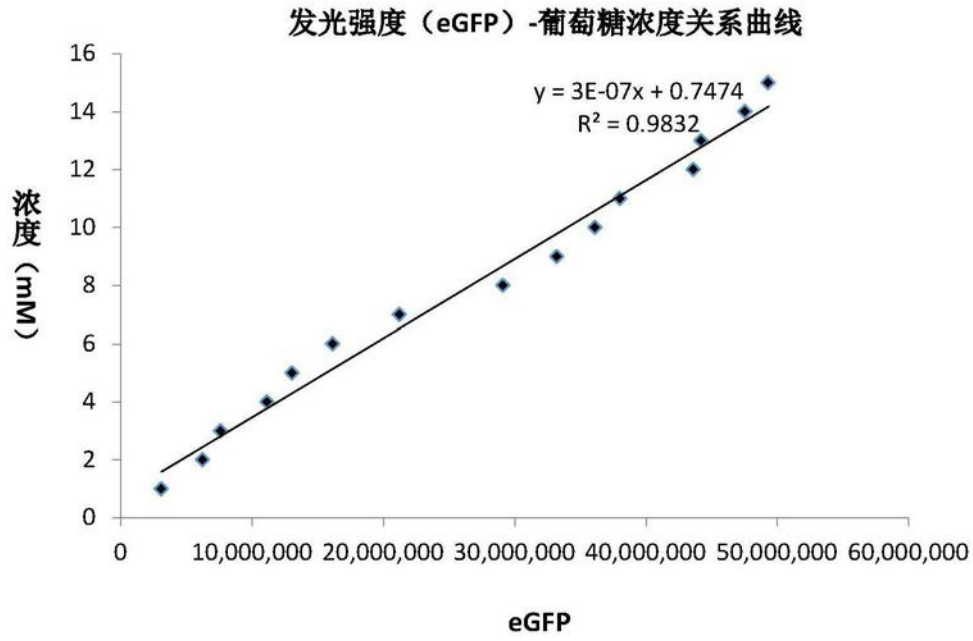


图3

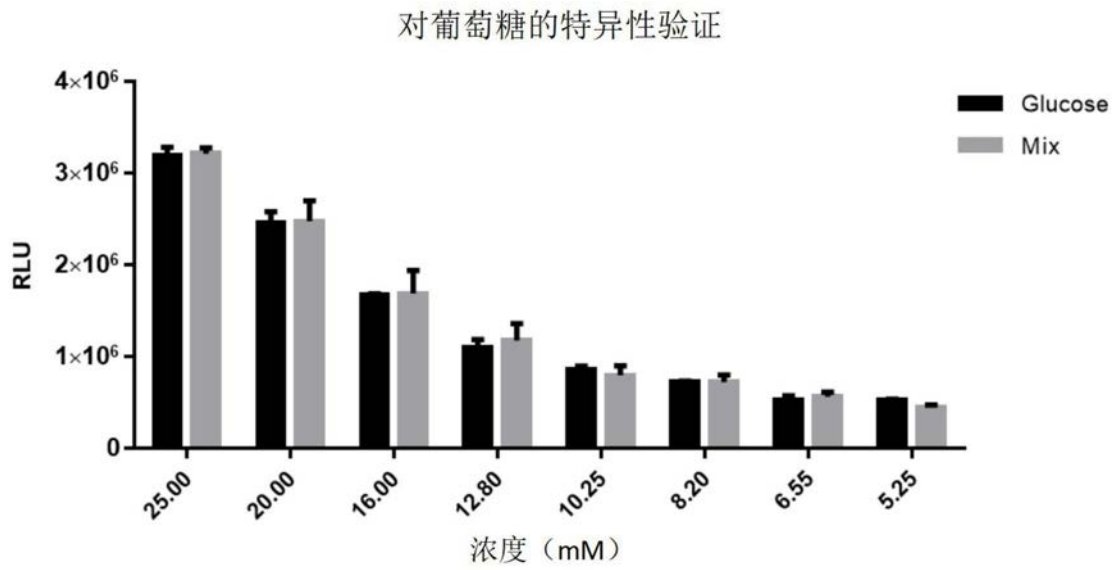


图4

本发明葡萄糖检测方法的准确度验证

	测定结果	血清样品浓度 (mM)	误差率 (%)
酶法测定 (mM)	3.10	3.00	3.33
本发明计算值 (mM)	2.81	3.00	-6.33

图5