



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108535489 A

(43)申请公布日 2018.09.14

(21)申请号 201710125619.9

(22)申请日 2017.03.04

(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 柴智 刘帅龙 符雷  
王海鹏 于雪

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

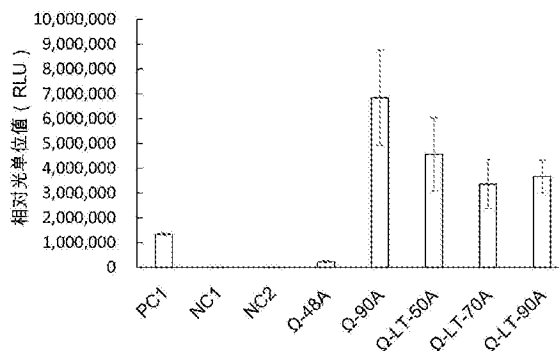
权利要求书1页 说明书14页  
序列表8页 附图7页

## (54)发明名称

一种用于体外蛋白质合成的蛋白合成体系、试剂盒及其制备方法

## (57)摘要

本发明提供了一种用于体外蛋白质合成的蛋白合成体系、试剂盒及其制备方法,具体地,本发明提供的体外无细胞表达系统不仅可以极其高效地合成蛋白,而且可以合成复杂蛋白,并且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比目前商业化体系(如兔子网织红细胞体外表达体系)高至少一个数量级( $\geq 10$ 倍或更高)。



1. 一种体外的无细胞的蛋白合成体系,其特征在于,所述无细胞的蛋白合成体系包括:
  - (a) 酵母细胞提取物;
  - (b) 聚乙二醇;
  - (c) 任选的外源蔗糖;和
  - (d) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。
2. 如权利要求1所述的蛋白合成体系,其特征在于,所述无细胞的蛋白合成体系还包括选自下组的一种或多种组分:
  - (e1) 用于合成RNA的底物;
  - (e2) 用于合成蛋白的底物;
  - (e3) 镁离子;
  - (e4) 钾离子;
  - (e5) 缓冲剂;
  - (e6) RNA聚合酶;
  - (e7) 能量再生系统。
3. 如权利要求1所述的蛋白合成体系,其特征在于,所述无细胞的蛋白合成体系还包括(f1) 人工合成的tRNA。
4. 如权利要求1所述的蛋白合成体系,其特征在于,所述无细胞的蛋白合成体系还包括(g1) 外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子。
5. 如权利要求1所述的蛋白合成体系,其特征在于,所述聚乙二醇选自下组:PEG3000、PEG8000、PEG6000、PEG3350、或其组合。
6. 如权利要求1所述的蛋白合成体系,其特征在于,所述蛋白合成体系中,组分(a)的浓度(v/v)为20%-70%,较佳地,30-60%,更佳地,40%-50%,以所述蛋白合成体系的总体积计。
7. 如权利要求1所述的蛋白合成体系,其特征在于,所述蛋白合成体系中,组分(b)的浓度(w/v)为0.1-8%,较佳地,0.5-4%,更佳地,1-2%。
8. 一种体外合成蛋白质的方法,其特征在于,包括步骤:
  - (i) 提供权利要求1所述的体外的无细胞的蛋白合成体系,并加入外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子;
    - (ii) 在适合的条件下,孵育步骤(i)的蛋白合成体系一段时间T1,从而合成由所述外源DNA编码的蛋白质。
9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述的方法还包括:(iii) 任选地从所述蛋白合成体系中,分离或检测所述的由外源DNA编码的蛋白质。
10. 一种用于体外无细胞合成蛋白的试剂盒,其特征在于,包括:
  - (k1) 第一容器,以及位于第一容器内的酵母细胞提取物;
  - (k2) 第二容器,以及位于第二容器内的聚乙二醇;
  - (k3) 任选的第三容器,以及位于第三容器的蔗糖;和
  - (kt) 标签或说明书。

## 一种用于体外蛋白质合成的蛋白合成体系、试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,涉及一种用于体外蛋白质合成的蛋白合成体系、试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 传统的蛋白表达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,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,是一种快速、省时、便捷的蛋白质表达方式。

[0003] 商业上,大肠杆菌体外合成系统应用较广。大肠杆菌容易培养和发酵,成本低,破碎细胞简单,能够合成较高产量的蛋白[1,2]。与原核系统相比,真核细胞的培养难度大,花费高,其细胞抽提物的制备过程繁琐,因而它们翻译系统成本较高、仅适合特殊的实验室使用。因此,适合工业大规模(吨级)制备和生产的真核体外蛋白表达系统目前尚不存在。

[0004] 因此,本领域迫切需要开发一种高产量、低成本的体外表达系统。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了一种高产量、低成本的体外表达系统。

[0006] 本发明提供一种以DNA为模板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。

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种酵母提取物的制备方法,本发明的第二个目的是提供一种体外蛋白质合成试剂盒。

[0008]

本发明第一方面提供了一种体外的无细胞的蛋白合成体系,所述无细胞的蛋白合成体系包括:

- (a) 酵母细胞提取物;
- (b) 聚乙二醇;
- (c) 任选的外源蔗糖;和
- (d) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0009] 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一种或多种组分:

- (e1) 用于合成RNA的底物;
- (e2) 用于合成蛋白的底物;
- (e3) 镁离子;

- (e4) 钾离子;
- (e5) 缓冲剂;
- (e6) RNA聚合酶;
- (e7) 能量再生系统。

[0010] 在另一优选例中,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、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。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 在另一优选例中,所述的酵母细胞提取物是用包括以下步骤的方法制备:

- (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;和
- (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。

[0014] 在另一优选例中,所述的固液分离包括离心。

[0015] 在另一优选例中,在液态下进行离心。

[0016] 在另一优选例中,所述离心条件为 $5000-100000 \times g$ ,较佳地, $8000-30000 \times g$ 。

[0017] 在另一优选例中,所述离心时间为 $0.5-2h$ ,较佳地, $20min-50min$ 。

[0018] 在另一优选例中,所述离心在 $1-10^{\circ}C$ 下进行,较佳地,在 $2-6^{\circ}C$ 下进行。

[0019] 在另一优选例中,所述的洗涤处理采用洗涤液在pH为7-8(较佳地,7.4)下进行处理。

[0020] 在另一优选例中,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。

[0021] 在另一优选例中,所述的破细胞处理包括高压破碎、冻融(如液氮低温)破碎。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 在另一优选例中,所述无细胞的蛋白合成体系还包括(f1) 人工合成的tRNA。

[0028] 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。

[0029] 在另一优选例中,所述无细胞的蛋白合成体系还包括(g1) 外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子。

- [0030] 在另一优选例中,所述的DNA分子为线性的。
- [0031] 在另一优选例中,所述的DNA分子为环状的。
- [0032] 在另一优选例中,所述的DNA分子含有编码外源蛋白的序列。
- [0033] 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。
- [0034] 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。
- [0035] 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: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、RNA聚合酶、或其组合。
- [0036] 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。
- [0037] 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。
- [0038] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,组分(a)的浓度(v/v)为20%-70%,较佳地,30-60%,更佳地,40%-50%,以所述蛋白合成体系的总体积计。
- [0039] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,组分(b)的浓度(w/v,例如g/ml)为0.1-8%,较佳地,0.5-4%,更佳地,1-2%。
- [0040] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,组分(c)的浓度为0.2-4%,较佳地,0.5-4%,更佳地,0.5-1%,以所述蛋白合成体系的总体积计。
- [0041] 在另一优选例中,所述核苷三磷酸选自下组:腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸、尿嘧啶核苷三磷酸、或其组合。
- [0042] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,组分(e1)的浓度为0.1-5mM,较佳地,0.5-3mM,更佳地,1-1.5mM。
- [0043] 在另一优选例中,所述氨基酸为选自下组: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、组氨酸、或其组合。
- [0044] 在另一优选例中,所述氨基酸包括D型氨基酸和/或L型氨基酸。
- [0045] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述组分(e2)的浓度为0.01-0.48mM,较佳地,0.04-0.24mM,更佳地,0.04-0.0.2mM,最佳地,0.08 mM。
- [0046] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述组分(e3)的浓度为1-10mM,较佳地,1-5mM,更佳地,2-4mM。
- [0047] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述组分(e4)的浓度为30-210mM,较佳地,30-150mM,更佳地,30-60mM。
- [0048] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,4-羟乙基哌嗪乙磺酸的浓度为10-50mM,较佳地,15-30mM,更佳地,20-25mM。
- [0049] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述醋酸钾的浓度为30-210mM,较佳地,30-150mM,更佳地,30-60mM。
- [0050] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述醋酸镁的浓度为1-10mM,较佳地,1-5mM,更佳地,2-4mM。

[0051] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述磷酸肌酸的浓度为10-50 mM,较佳地,20-30mM,更佳地,25mM。

[0052] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述二硫苏糖醇(DTT)的浓度为0.2-15mM,较佳地,0.2-7mM,更佳地,1-2mM。

[0053] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述磷酸肌酸激酶的浓度为0.1-1mg/ml,较佳地,0.2-0.5mg/ml,更佳地,0.27mg/ml。

[0054] 在另一优选例中,所述蛋白合成体系中,所述T7 RNA聚合酶的浓度为0.01-0.2mg/ml,较佳地,0.02-0.1mg/ml,更佳地,0.027-0.054mg/ml。

[0055] 在另一优选例中,所述的无细胞体外合成体系具有以下性能:

在合成体系里,蛋白合成总量达到3ug蛋白/ml体系。

[0056] 在另一优选例中,所述的无细胞的蛋白合成体系的组成包括:

	一般范围	优选范围
4-羟乙基哌嗪乙磺酸,	5-40mM;	10-30mM;
醋酸镁,	1-10mM;	2-5mM;
醋酸钾,	20-150mM;	30-75mM;
DTT,	0.5-5mM;	1-2mM;
磷酸肌酸,	15-50mM;	20-30mM;
磷酸肌酸激酶,	0.1-0.5mg/ml;	0.2-0.3mg/ml;
4种核糖核苷酸,	各0.5-5mM;	各1.0-2.0mM;
DNA 模板,	2-50ng/ul;	5-25ng/ul;
RNA聚合酶,	0.01-0.3mg/ml;	0.02-0.10mg/ml;
PEG,	0.5-5% (w/v)	1-3% (w/v)。

在另一优选例中,所述的PEG选自PEG3350、PEG3000、和/或PEG8000。

[0057] 在另一优选例中,所述RNA聚合酶为T7 RNA聚合酶。

[0058] 本发明第二方面提供了一种体外合成蛋白质的方法,包括步骤:

(i) 提供本发明第一方面所述的体外的无细胞的蛋白合成体系,并加入外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子;

(ii) 在适合的条件下,孵育步骤(i)的蛋白合成体系一段时间T1,从而合成由所述外源DNA编码的蛋白质。

[0059] 在另一优选例中,所述的方法还包括:(iii) 任选地从所述蛋白合成体系中,分离或检测所述的由外源DNA编码的蛋白质。

[0060] 在另一优选例中,所述外源DNA来自原核生物、真核生物。

[0061] 在另一优选例中,所述外源DNA来自动物、植物、病原体。

[0062] 在另一优选例中,所述外源DNA来自哺乳动物,较佳地灵长动物,啮齿动物,包括人、小鼠、大鼠。

[0063] 在另一优选例中,所述的外源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。

[0064] 在另一优选例中,所述外源DNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.:1-7的任一所示。

[0065] 在另一优选例中,所述步骤(ii)中,反应温度为20-37℃,较佳地,20-25℃。

[0066] 在另一优选例中,所述步骤(ii)中,反应时间为1-6h,较佳地,2-4h。

[0067] 本发明第三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聚乙二醇;
- (k3) 任选的第三容器,以及位于第三容器的蔗糖;和
- (kt) 标签或说明书。

[0068] 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。

[0069] 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:

- (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。

[0070]

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。

[0071]

## 附图说明

[0072] 图1是由DNA模板直接进行体外蛋白质合成的蛋白合成体系及对照反应的对比示意图。A为Buffer本身,B为未添加萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) DNA的体外蛋白质合成蛋白合成体系,C为添加了萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) DNA体外蛋白质合成蛋白合成体系。反应条件为20℃反应4 h。阴性对照A和B的活性分别为77 RLU和160 RLU。而反应样品的活性为1,303,884 RLU。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0073] 图2是不同反应缓冲液对体外蛋白质合成蛋白合成体系的影响示意图。A为Buffer本身,B为未添加萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) DNA的体外蛋白质合成蛋白合成体系,C为添加了萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) DNA在醋酸镁和醋酸钾反应液中的体外蛋白质合成蛋白合成体系,D为添加了萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) DNA在谷氨酸镁和谷氨酸钾反应液中的体外蛋白质合成蛋白合成体系。反应条件为20℃,反应2 h。阴性对照 A和B的活性分别为77 RLU和160 RLU。醋酸蛋白合成体系中,体外蛋白质合成的活性为1,303,884 RLU;谷氨酸蛋白合成体系中,体外蛋白质合成的活性为1,469,472 RLU。

[0074] 图3是不同菌液浓度和反应时间对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应温度为20℃,反应时间为2-6 h。两个菌液浓度,OD600=4.5和OD600=6.9。从图上可以看出OD600=6.9的菌的活性比OD600=4.5高。反应时间2-4 h,差异并不大。阴性对照无mRNA和buffer本身的活性分别为520 RLU和400 RLU。

[0075] 图4 是不同离心力处理酵母提取物对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条

件为20 °C,反应2 h。反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。A为Buffer本身,B为未添加萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) DNA的体外蛋白质合成反应,C为30,000 ×g离心处理的酵母提取物的体外蛋白质合成反应,D为18,000 ×g离心处理的酵母提取物的体外蛋白质合成反应,E为15,000 ×g离心处理的酵母提取物的体外蛋白质合成反应,F为12,000 ×g离心处理的酵母提取物的体外蛋白质合成反应。阴性对照无mRNA和buffer本身的活性分别为 200 RLU和320 RLU。

[0076] 图5是醋酸镁浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。蛋白合成蛋白合成体系里醋酸镁的浓度范围为1-8 mM,阴性对照无mRNA和buffer本身的活性分别为 80 RLU和40 RLU。

[0077] 图6是醋酸钾浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。蛋白合成蛋白合成体系里醋酸钾的浓度范围为30-180 mM,阴性对照无mRNA和buffer本身的活性分别为 80 RLU和40 RLU。

[0078] 图7是氨基酸浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。蛋白合成蛋白合成体系里氨基酸的浓度范围为0.04-0.24 mM,阴性对照无mRNA和buffer本身的活性分别为 52 RLU和90 RLU。

[0079] 图8是ATP浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。蛋白合成蛋白合成体系里ATP的浓度范围为0.04-0.24 mM,阴性对照无mRNA和buffer本身的活性分别为 52 RLU和90 RLU。

[0080] 图9是荧光素酶基因不同序列的名称及序列结构的示意图。其中包括基因序列的5'端和3'端的序列,多聚腺嘌呤核苷酸的数目等。Omega序列来源于烟草花叶病毒,CrPV序列来源于蟋蟀麻痹病毒,而SITS2序列是来源于一种非依赖性的翻译起始序列。同时,多聚腺嘌呤核苷酸数目包括48A、70A和90A。

[0081] 图10是荧光素酶基因3'端非翻译区多聚腺嘌呤脱氧核苷酸对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。PC1表示的是商品化的兔网织红细胞体外蛋白合成体系,作为阳性对照。NC1是阴性对照无DNA模板的体外蛋白合成蛋白合成体系,NC2是阴性对照buffer体系。阳性对照PC1的活性为1,334,396 RLU。阴性对照无DNA和buffer本身的活性分别为 66 RLU和69 RLU。

[0082] 图11是荧光素酶基因5'端序列对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。NC表示的是阴性对照无DNA模板的体外蛋白合成蛋白合成体系,其活性为44 RLU。

[0083] 图12是不同PEG和不同的浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。其中PEG包含三种,PEG3350、PEG8000和PEG3000。每种PEG在蛋白合成体系中包含0.5 %、1 %、2 %和4 % 三到四种浓度。NC表示的是阴性对照无DNA模板的体外蛋白质合成蛋白合成体系,其活性为44 RLU。

[0084] 图13是蔗糖浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。在蛋白合成体系中包含的蔗糖浓度为0.5 %、1 %和2 %三种浓度。NC表示的是阴性对照无DNA模板的体外蛋白质合成蛋白合成体系,其活性为190 RLU。

[0085]

### 具体实施方式

[0086] 经过广泛而深入的研究,通过大量筛选和摸索,首次意外地发现了一种可大幅度提高产量、降低成本的体外的无细胞表达系统。与商业上的无细胞表达体系(如兔子网织红细胞体外表达体系)相比,本发明的体外无细胞表达系统不仅可以极其高效地合成蛋白,而且可以合成复杂蛋白,例如糖基化蛋白。在此基础上,本发明人完成了本发明。

[0087] 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。

[0088]

#### 术语

如本文所用,术语“本发明的表达系统”、“本发明的体外表达系统”、“体外无细胞表达系统”、“体外无细胞表达体系”可互换使用,指本发明的基于酵母的、不含活细胞的体外蛋白表达体系。

[0089]

#### 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。

[0090] 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。

[0091] 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)。

[0092]

#### 蛋白合成体系

本发明提供了一种体外的无细胞的蛋白合成体系,所述合成体系包括:

- (a) 酵母细胞提取物;
- (b) 聚乙二醇;
- (c) 任选的外源蔗糖;和
- (d) 任选的溶剂,所述溶剂为水或水性溶剂。

[0093] 在一特别优选的实施方式中,本发明提供的体外蛋白合成体系包括:酵母细胞提取物,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,荧光素,荧光素酶DNA,RNA聚合酶。

[0094] 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。

[0095] 在本发明中,所述酵母细胞提取物在体外蛋白合成体系中的比例不受特别限制,

通常所述酵母细胞提取物在体外蛋白质合成蛋白合成体系中所占体系为20-70%，更佳地，30-60%，更佳地，40-50%。

[0096] 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。

[0097] 在本发明中，所述的酵母细胞提取物所含蛋白含量为20-100mg/ml， 较佳为50-100mg/ml。所述的测定蛋白含量方法为考马斯亮蓝测定方法。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 在一优选实施方式中，所述离心在液态下进行。

[0101] 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。

[0102] 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0.5min-2h，较佳地，20min-50min。

[0103] 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℃下进行，较佳地，在2-6℃下进行。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 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0.5-5mM，较佳地为1.0-2.0mM。

[0107] 所述体外蛋白质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0.01-0.5mM，较佳地0.02-0.2mM，如0.05、0.06、0.07、0.08 mM。

[0108] 在优选例中，所述体外蛋白质合成体系还含有聚乙二醇或其类似物。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)。

[0109] 在优选例中,所述体外蛋白质合成体系还含有蔗糖。蔗糖的浓度没有特别限制,通常,蔗糖的浓度为0.2-4%,较佳地,0.5-4%,更佳地,0.5-1%,以所述蛋白合成体系的总体积计。

[0110] 一种特别优选的体外蛋白质合成体系,除了酵母提取物之外,还含有以下组分: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,1%-4%聚乙二醇,0.5%-2%蔗糖,8-20ng/ $\mu$ l萤火虫荧光素酶的DNA,0.027-0.054 mg/mL T7 RNA聚合酶。

[0111]

#### 外源DNA

当用于体外蛋白合成时,所述无细胞的蛋白合成体系还包括(g1) 外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子。通常,所述的DNA分子为线性的或环状的。所述的DNA分子含有编码外源蛋白的序列。

[0112] 在本发明中,所述的编码外源蛋白的序列的例子包括(但不限于):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。

[0113] 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。

[0114] 一类代表性的外源DNA的序列选自:SEQ ID NO.:1-SEQ ID NO.:7。

[0115]

#### 试剂盒

本发明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聚乙二醇;
- (k3) 任选的第三容器,以及位于第三容器的蔗糖;和
- (kt) 标签或说明书。

[0116] 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。

[0117] 一种特别优选的体外蛋白质合成的试剂盒包含一个体外蛋白质合成蛋白合成体系,该蛋白合成体系包括:酵母细胞提取物,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,荧光素,荧光素酶DNA, T7 RNA聚合酶。

[0118]

本发明的主要优点包括:

(1) 本发明的试剂盒可以用于DNA为模板的体外蛋白质合成,比用RNA为模板的体外蛋白表达更简单快捷。

[0119] (2) 与传统的蛋白表达系统相比,本发明的酵母体外表达系统省略了耗时耗力的质粒转化、细胞培养、收集、破碎和离心等步骤,极大地提高了工作效率,并且合成的蛋白更易于提纯,为使用者节省大量时间和成本。

[0120] (3) 与传统原核体外表达系统相比,本发明的酵母体外表达系统表达的具有活性的蛋白质种类更多,尤其在表达膜蛋白,细胞毒性蛋白,分子伴侣,大分子蛋白复合物等方面具有明显的优势。

[0121] (4) 经高压破碎法或液氮破碎法制备的酵母提取物具有直接利用DNA模板合成蛋白的能力并经过反应条件的优化,如醋酸镁,醋酸钾,氨基酸,ATP,不同序列组成的DNA模板,聚乙二醇,蔗糖的优化等,所合成荧光素酶的相对活性已经达到60,000,000 RLU,而商业上无细胞表达体系如兔子网织红细胞体外表达体系,其合成的荧光素酶的活性仅为1,000,000 RLU。

[0122] (5) 本发明采用最佳条件合成的荧光素酶活性的相对光单位值是商业化体系的60倍。

[0123] (6) 本发明中制备的酵母提取物及试剂盒制备不仅克服现有技术的缺陷,同时具有比现有技术更大的优势和前景。同时,本发明的中所使用的原料酵母细胞,培养简单,操作方便,繁殖迅速,成本较低,适合大规模制备,具有工业生产的优势,而且本发明所采用的破碎方法:高压均质器破碎法和液氮机械破碎法,简便高效易于放大,适于工业化生产的大规模制备。

[0124]

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。

[0125] 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。

[0126]

#### 实施例1:高压破碎制备酵母细胞提取物

1.1 酵母种子液的制备:从平板上挑取乳酸克鲁维酵母的单菌落,接种于含50 mL YPD培养基(YPD培养基的成分为:1 % 酵母提取物,2 % 蛋白胨,2 % 葡萄糖,pH 5.5)的250 mL的三角烧瓶中(装液量为20 %,下同),并将接种好的三角烧瓶放置于摇床中培养,培养条件:温度为30 °C,转速为200 rpm,培养24 h后得到的即为种子液;

1.2 酵母细胞的培养:按0.1-1 %的接种量把1.1中制备好的种子液接种到含有400 mL YPD培养基的2 L三角烧瓶中,并放置于摇床中培养,培养条件:温度为30 °C,转速为200 rpm。在酵母生长对数期的中后期(OD<sub>600</sub>=3.0-6.9),结束培养,得到细胞培养液;

1.3 将1.2中培养好的细胞培养物放在冰水混合物中预冷,时间为10-30 min。

[0127] 1.4 将1.3中预冷好的细胞培养物在低温离心机中进行离心,离心条件:3,000 × g、10 min、4 °C,得到酵母细胞。

[0128] 1.5 用预冷的Washing buffer对1.4中得到的酵母细胞进行重悬,Washing buffer用量为50-100 ml/L培养液。重悬液在低温离心机中进行离心,离心条件:3000 × g、10

min、4 °C,得到酵母细胞。Washing buffer组成为:10-40 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾, 50-150 mM醋酸钾,1-4 mM醋酸镁;

1.6重复1.5步骤2-3次。

[0129] 1.7将1.6步中获得的酵母细胞直接进行后续操作,或者采用液氮进行速冻后-80 °C保存。

[0130] 1.8采用高压均质器对酵母细胞进行破碎:按照每克酵母细胞用0.2-0.5 mL buffer A 进行重悬,将重悬液通过高压均质器进行破碎处理,得到细胞粗提取物。高压破碎的条件:压力为1000-1400 bar,温度为4 °C,破碎次数为一次或多次。

[0131] 1.9把步骤1.8中收获的酵母细胞粗提物进行离心1-2次,离心力为12000-30000 × g,时间为30 min,温度为4 °C;

1.10离心后,取上层澄清液体即为酵母细胞提取物。

[0132] 1.11将制备好的酵母细胞提取物分装,在液氮中速冻后于-80 °C保存。

[0133] 用考马斯亮蓝测定方法测定,不同批次的酵母细胞提取物中所含蛋白含量为约20-100mg/ml,平均约60-70mg/ml。

[0134]

实施例2:液氮破碎法制备酵母细胞提取物

2.1酵母种子液的制备:从平板上挑取乳酸克鲁维酵母的单菌落,接种于含50 mL YPD培养基(YPD培养基的成分为:1 % 酵母提取物,2 % 蛋白胨,2 % 葡萄糖,pH 5.5)的250 mL的三角烧瓶中(装液量为20 %,下同),并将接种好的三角烧瓶放置于摇床中培养,培养条件:温度为30 °C,转速为200 rpm。培养24 h后得到的即为种子液;

2.2酵母细胞的培养:按0.1-1 %的接种量把2.1中制备好的种子液接种到含有400 mL YPD培养基的2 L三角烧瓶中,并放置于摇床中培养,培养条件:温度为30 °C,转速为200 rpm。在酵母生长对数期的中后期(OD<sub>600</sub>=3.0-6.9),结束培养,得到细胞培养液;

2.3将2.2中培养好的细胞培养物放在冰水混合物中预冷,时间为10-30 min。

[0135] 2.4将2.3中预冷好的细胞培养物在低温离心机中进行离心,离心条件:3,000 × g、10 min、4 °C,得到酵母细胞。

[0136] 2.5用预冷的Washing buffer对2.4得到酵母细胞进行重悬,Washing buffer用量为50-100 ml/L培养液。将得到的重悬液在低温离心机中进行离心,离心条件:3000 × g、10 min、4 °C,得到酵母细胞。Washing buffer组成为:20-30 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾, 100-150 mM醋酸钾,1-4 mM醋酸镁;

2.6重复2.5步2-3次。

[0137] 2.7将2.6步中获得的酵母细胞直接进行后续操作,或者采用液氮进行速冻后-80 °C保存。

[0138] 2.8 采用液氮匀浆器进行破碎:在匀浆器中加入适量液氮,再加入离心得到的酵母细胞或2.7中-80 °C保存的酵母细胞,转速:45,000 rpm,破碎3-10 min;将破碎好的低温粉末分装到50 mL离心管中,称重并储存于-80 °C待用。

[0139] 2.9将2.8中得到的酵母细胞破碎粉在室温下降温至4 °C,每克细胞破碎粉用0.2-1 mL 4 °C预冷的Lysis buffer进行溶解,得到酵母细胞粗提物。Lysis buffer由10-40 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾, 50-150 mM醋酸钾,1-4 mM醋酸镁,2-7 mM二硫苏糖醇,

0.5-2 mM苯甲基磺酰氟组成。

[0140] 2.10把步骤2.9中收获的酵母细胞粗提物进行离心1-2次,离心力为12000-30000 ×g时间为30 min,温度为4 °C;

2.11离心后,取上层澄清液体即为酵母细胞提取物。

[0141] 2.12将制备好的酵母细胞提取物分装,并在液氮中速冻后于-80 °C保存。

[0142] 用考马斯亮蓝测定方法测定,不同批次的酵母细胞提取物中所含蛋白含量为约25-100mg/ml,平均约60-70mg/ml。

[0143]

实施例3:无细胞体外蛋白质合成体系

3.1体外蛋白质合成体系的储存液配制:1M pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,5 M醋酸钾,250 mM醋酸镁,25 mM四种核苷三磷酸的混合物,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,1 mM二十种氨基酸的混合物: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,二十种氨基酸的浓度均为1.0 mM,1M磷酸肌酸,1M二硫苏糖醇,6.48 mg/mL磷酸肌酸激酶,1.7 mg/ml T7 RNA聚合酶,20% - 50% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) 3350或者(polyethylene glycol, PEG) 8000, 20% - 40% 蔗糖;

3.2体外蛋白质合成反应体系: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,1.5-4mM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,8-20 ng/μL萤火虫荧光素酶DNA,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;

3.3体外蛋白质合成反应:将上述的反应体系放置在20-30 °C的环境中,静置反应2-6 h;

3.4萤火虫酶活性测定: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,检测萤火虫荧光素酶活性,相对光单位值(RLU)作为活性单位,如图1-图8,图10-图13所示。

[0144]

实验结果

1.DNA为模板的体外蛋白质合成体系

从图1可以看出,在反应条件为20 °C反应2 h的情况下,体外蛋白质合成反应体系的相对光单位值为1,303,884 (Relative Light Unit, RLU),无DNA和buffer本身阴性对照的活性分别为77 RLU和160 RLU。由此可见,酵母提取液具有较强的体外蛋白合成能力。

[0145] 2.反应缓冲液对体外蛋白质合成反应体系的影响

从图2可以看出,相同的反应条件,20 °C反应2 h。阴性对照 A和B的活性分别为77 RLU和160 RLU。醋酸反应体系和谷氨酸反应体系没有明显的活性区别,活性分别为1,303,

884 RLU和1,469,472 RLU。

#### [0146] 3. 菌液浓度对体外蛋白质合成体系的影响

从图3可以看出,用不同OD600值收获的菌制备得到的提取物在相同的反应时间有一定的差异,反应温度为20 °C,反应时间为2-6 h,从图上可以看出OD600=6.9的菌体外合成蛋白质的活性比OD600=4.5高。但是反应时间对体外合成蛋白质的能力影响并不大。其中OD600为6.9的酵母提取物的蛋白质合成活性可达到125,346 RLU。

#### [0147] 4. 不同离心力处理的酵母提取液对体外蛋白质合成体系的影响

从图中可以看出,当反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系,离心力分别为30,000 ×g (C),18,000 ×g (D),15,000 ×g (E),12,000 ×g (F)处理得到的酵母提取物在体外蛋白质合成反应中没有较大的差异,活性均在1,000,000 RLU以上。阴性对照无DNA和buffer本身的活性分别为200 RLU和320 RLU。

#### [0148] 5. 醋酸镁浓度对体外蛋白质合成体系的影响

此反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系,反应体系里醋酸镁的浓度范围为1-8 mM时。从图5可以看出,在1-5 mM的醋酸镁的反应体系中,酵母细胞提取物合成荧光素酶的相对光单位值均不低于1,000,000 RLU,其中2 mM的醋酸镁的蛋白合成能力最高,相对光单位值可达2,884,286 RLU;而6-8 mM的醋酸镁使得合成的荧光素酶的相对光单位值降低。

#### [0149] 6. 醋酸钾浓度对体外蛋白质合成体系的影响

在体外蛋白质合成反应体系中,采用了30、45、60、75、90、120、150和180 mM的醋酸钾,20 °C反应2 h,结果如图6所示,从图6可以看出,醋酸钾浓度在30-180 mM区间里,其相对光单位值都不低于1,000,000 RLU,效果最好的为30 mM醋酸钾,其相对光单位值达3,338,091 RLU。

#### [0150] 7. 氨基酸浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。

[0151] 此反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。蛋白合成反应体系里氨基酸的浓度范围为0.04-0.24 mM。从图7可以看出,当氨基酸的浓度为0.08-0.24 mM区间里,其相对光单位值都不低于1,000,000 RLU,不同氨基酸浓度间的活性差异较小。

#### [0152] 8. ATP浓度对体外蛋白质合成体系的影响

此反应条件为20 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。蛋白合成反应体系里ATP的浓度范围为1.5-4.5 mM。从图8可以看出,当ATP的浓度为2.5、3和4mM时,其相对光单位值都不低于1,000,000 RLU,活性差异较小。低于1.5 mM或高于4.0 mM的ATP均对体外蛋白合成能力有影响。

#### [0153] 9. 不同的DNA模板的荧光素酶基因的结构组成

图9中包括应用于此蛋白质体外合成体系中的七种不同的荧光素酶基因模板,其中序列包括不同的5'端,如omega序列,SITS2序列及CrPV序列。3'端的序列主要包括来自lacZ的终止子序列,及不同的多聚腺嘌呤核苷酸的数目。

#### [0154] 10. 荧光素酶基因3'端序列对体外蛋白质合成体系的影响。

[0155] 反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。PC1表示的是商品化的兔网织红细胞体外蛋白合成体系。从图10可以看出,与阳性对照相比的,50A、70A、90A、以及包含lacZ 终止子序列的荧光素酶基因都能在酵母提取物中进行翻译,其中90A的

活性最高,其相对光单位值为6,844,583 RLU,而商品化的兔网织红细胞体外合成荧光素酶的相对光单位仅为1,000,000 RLU。阴性对照无DNA和buffer本身的活性分别为 66 RLU和 69 RLU。

[0156] 11. 荧光素基因5'端序列对体外蛋白质合成体系的影响

反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。从图11可以看出,与阴性对照相比,荧光素酶基因5'端的omega序列,CrPV序列及SITS2序列均能够使荧光素酶基因在酵母提取物中表达,其中活性最高的是SITS2序列,其相对光单位值为5,816,496 RLU。而omega序列的体外蛋白合成体系的相对光单位值为3,458,701 RLU。

[0157] 12. PEG对体外蛋白质合成体系的影响

反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。由图12可以看出,与没有添加PEG的反应体系相比,三种PEG均显著提高了酵母提取物体外蛋白合成的能力,其中2% PEG3350、2% PEG8000和4% PEG8000表现尤其突出,相对光单位值可达到60,000,000 RLU。

[0158] 13. 图13是蔗糖浓度对体外蛋白质合成体系的影响

反应条件为25 °C反应2 h,反应缓冲液为醋酸镁和醋酸钾体系。由图13可见,与没有添加蔗糖的反应体系相比,蔗糖浓度为0.5%、1%和2%三种浓度均提高了酵母提取物体外蛋白合成的能力,其中0.5% 浓度表现尤为突出。NC表示的是阴性对照无DNA模板的体外蛋白质合成反应体系,其活性为190 RLU。

[0159] 本发明结果表明:经高压破碎法或液氮破碎法制备的酵母提取物具有直接利用DNA模板合成蛋白的能力。同时经过各种反应条件的优化,如醋酸镁,醋酸钾,氨基酸,ATP,不同序列组成的DNA模板,聚乙二醇,蔗糖的优化等,所合成荧光素酶的相对活性已经达到60,000,000 RLU,商业上无细胞表达体系如兔子网织红细胞体外表达体系,其活性仅为1,000,000 RLU。本发明采用最佳条件合成的荧光素酶活性的相对光单位值是商业化体系的60倍,体现了该发明的极大的优势。

[0160]

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。

[0161]

参考文献:

1.Kim HC, Kim TW, Kim DM. Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. *Process Biochemistry*. 2011; 46 (6):1366-9.

2.Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011; 108 (7):1570-8.。

## SEQUENCE LISTING

<110> 康码(上海)生物科技有限公司

<120> 一种用于体外蛋白质合成的蛋白合成体系、试剂盒及其制备方法

<130> 2010

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1773

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```
ggtattttta caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attactattt 60
acaattacaa tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatcctcta 120
gaggatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggetatga agagatacgc cctggttcct 180
ggaacaattg cttttacaga tgcacatata gaggtgaaca tcacgtacgc ggaatacttc 240
gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga 300
atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc cgggtttggg cgcgttattt 360
atcggagttg cagttgcgcc cgcgaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt 420
atgaacattt cgcagcctac cgtagtgttt gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg 480
aacgtgcaaa aaaaattacc aataatccag aaaattatta tcatggatte taaaacggat 540
taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatete atctacctcc cggttttaat 600
gaatacgatt ttgtaccaga gtcctttgat cgtgacaaaa caattgcact gataatgaat 660
tcctctggat ctactggggt acctaagggt gtggccette cgcatagaac tgcctgcgctc 720
agattctcgc atgccagaga tcctattttt ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt 780
ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctacactcgg atatttgata 840
tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgttttt acgatccctt 900
caggattaca aaattcaaag tgcgttgcta gtaccaacce tattttcatt cttcgccaaa 960
agcactctga ttgacaaaata cgatttatct aatttacacg aaattgcttc tgggggcgca 1020
cctctttcga aagaagtcgg ggaagcgggt gcaaacgct tccatcttcc agggatacga 1080
caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacaccga ggggatgat 1140
aaaccgggcg cggtcggtaa agttgttcca ttttttgaag cgaaggttgt ggatctggat 1200
accgggaaaa cgctgggcgt taatcagaga ggcaattat gtgtcagagg acctatgatt 1260
atgtccggtt atgtaaacaa tccggaagcg accaacgect tgattgacaa ggatggatgg 1320
ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat agttgaccgc 1380
ttgaagtctt taattaaata caaaggatat caggtggccc ccgctgaatt ggaatcgata 1440
ttgttacaac accccaacat cttcgacgcg ggcgtggcag gtcttcccga cgatgacgcc 1500
ggatgaactc ccgccgccgt tgttgttttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag 1560
atcgtggatt acgtcgccag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgcgg aggagtttgt 1620
```

```

tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag 1680
atcctcataa aggccaagaa gggcggaaag tccaaattgg tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1773
<210> 2
<211> 1815
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 2
ggtatTTTTT caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attactattt 60
acaattacaa tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatcctcta 120
gaggatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatacgc cctggttcct 180
ggaacaattg cttttacaga tgcacatata gaggtgaaca tcacgtacgc ggaatacttc 240
gaaatgtccg ttcggttggc agaagetatg aaacgatatg ggctgaatac aatcacaga 300
atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc cgggtttggg cgcgttattt 360
atcggagttg cagttgcgcc cgcgaaacgc atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt 420
atgaacattt cgcagcctac cgtagtgttt gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg 480
aacgtgcaaa aaaaattacc aataatccag aaaattatta tcatggatte taaaacggat 540
taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtacacatctc atctacctcc cggttttaat 600
gaatacagatt ttgtaccaga gtcctttgat cgtgacaaaa caattgcact gataatgaat 660
tcctctggat ctactgggtt acctaagggt gtggcccttc cgcatagaac tgctgcgctc 720
agattctcgc atgccagaga tcctatTTTT ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt 780
ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctacactcgg atatttgata 840
tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgttttt acgatccctt 900
caggattaca aaattcaaag tgcgttgcta gtaccaacce tattttcatt cttcgccaaa 960
agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacacg aaattgcttc tgggggcgca 1020
cctctttcga aagaagtcgg ggaagcgggt gcaaacgct tccatcttcc aggatacga 1080
caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacaccgga ggggatgat 1140
aaaccgggcg cggctcggtaa agttgttcca tttttgaag cgaaggttgt ggatctggat 1200
accgggaaaa cgctgggcgt taatcagaga ggcaattat gtgtcagagg acctatgatt 1260
atgtccggtt atgtaaacia tccggaagcg accaacgctt tgattgacia ggatggatgg 1320
ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat agttgaccgc 1380
ttgaagtctt taattaaata caaaggatat caggtggccc ccgctgaatt ggaatcgata 1440
ttgttacaac accccaacat cttcgacgcg ggcgtggcag gtcttcccga cgatgacgcc 1500
ggtgaacttc ccgccgccgt tgttgTTTTG gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag 1560
atcgtggatt acgtcggcag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgcgg aggagttgtg 1620
tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag 1680
atcctcataa aggccaagaa gggcggaaag tccaaattgg tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
aaaaaaaaaa aaaaaa 1815

```

<210> 3

<211> 2076

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

```

ggtattttta caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attactat 60
acaattacaa tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatcctcta 120
gaggatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatacgc cctggttcct 180
ggaacaattg cttttacaga tgcacatac gaggtgaaca tcacgtacgc ggaatacttc 240
gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg ggctgaatac aatcacaga 300
atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc cgggtttggg cgcgttattt 360
atcggagttg cagttgcgcc cgcaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt 420
atgaacattt cgcagcctac cgtagtgttt gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg 480
aacgtgcaaa aaaaattacc aataatccag aaaattatta tcatggatte taaaacggat 540
taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gteacatctc atctacctec cggttttaat 600
gaatacgatt ttgtaccaga gtcctttgat cgtgacaaaa caattgcact gataatgaat 660
tcctctggat ctactgggtt acctaagggt gtggcccttc cgcatagaac tgctgcgctc 720
agattctcgc atgccagaga tcctatTTTT ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt 780
ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctactctcg atatttgata 840
tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgttttt acgatccctt 900
caggattaca aaattcaaag tgcgttgcta gtaccaacce tattttcatt cttecgcaaa 960
agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacag aaattgcttc tgggggcgca 1020
cctctttcga aagaagtcgg ggaagcgggt gcaaacgct tccatcttcc aggatacga 1080
caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacaccgga ggggatgat 1140
aaaccgggcg cggctcggtaa agttgttcca tttttgaaag cgaaggttgt ggatctggat 1200
accgggaaaa cgctgggcgt taatcagaga ggcaattat gtgtcagagg acctatgatt 1260
atgtccgggt atgtaaaca tccggaagcg accaacgct tgattgacaa ggatggatgg 1320
ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat agttgaccgc 1380
ttgaagtctt taattaaata caaaggatat caggtggccc ccgctgaatt ggaatcgata 1440
ttgttacaac accccaacat cttcgacgcg ggcgtggcag gtcttcccga cgatgacgcc 1500
ggtgaacttc ccgccccgt tgttgttttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag 1560
atcgtggatt acgtgccag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgagg aggagttgtg 1620
tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag 1680
atcctcataa aggccaagaa gggcgaaaag tccaaattgg ttaattttat acttagataa 1740
gtatgtactt acaggtatat ttctatgaga tactgatgta tacatgcatg ataatattta 1800
aacggttatt agtgccgatt gtcttgtgag ataatgacgt tcctatcaaa gcaatacact 1860
taccacctat tacatgggcc aagaaaatat tttcgaactt gtttagaata ttagcacaga 1920
gtatatgatg ttatccgta gattatgcat gattcattcc tacaactttt tcgtagcata 1980
aggattaatt acttggatgc caataaaaaa aaaaaagcga catagcaaaa aaaaaaaaaa 2040

```

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	2076
<210> 4	
<211> 2096	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 4	
ggtatTTTTT caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attactattt	60
acaattacaa tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatcctcta	120
gaggatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatacgc cctggttcct	180
ggaacaattg cttttacaga tgcacatac gaggtgaaca tcacgtacgc ggaatacttc	240
gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga	300
atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctettcaa ttctttatgc cgggtttggg cgcgttattt	360
atcggagttg cagttgcgcc cgcgaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt	420
atgaacattt cgcagcctac cgtagtgttt gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg	480
aacgtgcaaa aaaaattacc aataatccag aaaattatta tcatggattc taaaacggat	540
taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatctc atctacctec cggttttaat	600
gaatacagatt ttgtaccaga gtcctttgat cgtgacaaaa caattgcact gataatgaat	660
tcctctggat ctactgggtt acctaagggt gtggcccttc cgcatagaac tgctgcgtc	720
agattctcgc atgccagaga tcctatTTTT ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt	780
ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctacactcgg atatttgata	840
tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgttttt acgatecctt	900
caggattaca aaattcaaag tgcgttgcta gtaccaacce tattttcatt cttcgcaaaa	960
agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacag aaattgcttc tgggggcgca	1020
cctctttcga aagaagtcgg ggaagcgggt gcaaacgct tccatcttcc aggatacga	1080
caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacaccga ggggatgat	1140
aaaccgggcg cggctcgtaa agttgttcca tttttgaag cgaaggttgt ggatctggat	1200
accgggaaaa cgctgggcgt taatcagaga ggcaattat gtgtcagagg acctatgatt	1260
atgtccgggt atgtaaaca tccggaagcg accaacgct tgattgacaa ggatggatgg	1320
ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat agttgaccgc	1380
ttgaagtctt taattaaata caaaggatat caggtggccc ccgctgaatt ggaatcgata	1440
ttgttacaac accccaacat cttcgacgcg ggcgtggcag gtcttcccga cgatgacgcc	1500
ggtgaacttc ccgccccgt tgttgttttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag	1560
atcgtggatt acgtcggcag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgagg aggagtgtg	1620
tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag	1680
atcctcataa aggccaagaa gggcgaaaag tccaaattgg ttttaatttat acttagataa	1740
gtatgtactt acaggtatat ttctatgaga tactgatgta tacatgcatg ataatttta	1800
aacggttatt agtgccgatt gtcttgtgcg ataatgacgt tcctatcaaa gcaatacact	1860
taccacctat tacatgggccc aagaaaatat tttcgaactt gtttagaata ttagcacaga	1920
gtatatgatg ttatccgta gattatgcat gattcattcc tacaactttt tcgtagcata	1980

aggattaatt acttggatgc caataaaaaa aaaaaagcga catagcaaaa aaaaaaaaaa	2040
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	2096
<210> 5	
<211> 2117	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 5	
ggtatttttta caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attactat	60
acaattacaa tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatcctcta	120
gaggatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatacgc cctggttcct	180
ggaacaattg cttttacaga tgcacatata gaggtgaaca tcacgtacgc ggaatacttc	240
gaaatgtccg ttcggttggc agaagetatg aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga	300
atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctettcaa ttctttatgc cgggtttggg cgcgttattt	360
atcggagttg cagttgcgcc cgcaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt	420
atgaacattt cgcagcctac cgtagtgttt gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg	480
aacgtgcaaa aaaaattacc aataatccag aaaattatta tcatggattc taaaacggat	540
taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatctc atctacctec cggttttaat	600
gaatacgatt ttgtaccaga gtcctttgat cgtgacaaaa caattgcact gataatgaat	660
tcctctggat ctactggggtt acctaaagggt gtggcccttc cgcatagaac tgctgcgctc	720
agattctcgc atgccagaga tcctatTTTT ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt	780
ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctactctgg atatttgata	840
tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgttttt acgatccctt	900
caggattaca aaattcaaag tgcgttgcta gtaccaacce tattttcatt cttcgcaaaa	960
agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacacg aaattgcttc tgggggcgca	1020
cctctttcga aagaagtcgg ggaagcgggt gcaaacgct tccatcttcc aggatacga	1080
caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacaccgga ggggatgat	1140
aaaccgggcg cggctcggtaa agttgttcca tttttgaaag cgaaggttgt ggatctggat	1200
accgggaaaa cgctgggcgt taatcagaga ggcaattat gtgtcagagg acctatgatt	1260
atgtccgggt atgtaaacaa tccggaagcg accaacgctt tgattgacaa ggatggatgg	1320
ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat agttgaccgc	1380
ttgaagtctt taattaaata caaaggatat caggtggccc ccgctgaatt ggaatcgata	1440
ttgttacaac accccaacat cttcgacgcg ggcgtggcag gtcttcccga cgatgacgcc	1500
ggtgaacttc ccgccccgt tgttgttttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag	1560
atcgtggatt acgtcgccag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgagg aggagttgtg	1620
tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag	1680
atcctcataa aggccaagaa gggcggaag tccaaattgg ttttaatttat acttagataa	1740
gtatgtactt acaggtatat ttctatgaga tactgatgta tacatgcatg ataatattta	1800
aacggttatt agtgccgatt gtcttgtgag ataatgacgt tcctatcaaa gcaatacact	1860
taccacctat tacatgggcc aagaaaatat tttcgaactt gtttagaata ttagcacaga	1920

gtatatgatg ttatccgta gattatgcat gattcattcc tacaactttt tcgtagcata 1980  
 aggattaatt acttggatgc caataaaaaa aaaaaagcga catagccaaa aaaaaaaaaa 2040  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100  
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 2117  
 <210> 6  
 <211> 2242  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <400> 6  
 gagaaagcaa aaatgtgac ttgcttgtaa atacaatttt gagaggtaa taaattacaa 60  
 gtagtgctat ttttgtatth aggttagcta ttagcttta cgttccagga tgcctagtgg 120  
 cagccccaca atatccagga agccctctct gcggttttcc agattaggta gtcgaaaaac 180  
 ctaagaaatt tacctatgga agacgcaaaa aacataaaga aaggccccgc gccattctat 240  
 cctctagagg atggaaccgc tggagagcaa ctgcataagg ctatgaagag atacgccctg 300  
 gttcctggaa caattgctth tacagatgca catatcgagg tgaacatcac gtacgcggaa 360  
 tacttcgaaa tgtccgttcg gttggcagaa gctatgaaac gatatgggct gaatacaaat 420  
 cacagaatcg tcgatgcag tgaaaactct cttcaattct ttatgccggt gttgggcgcg 480  
 ttatttatcg gaggttgcagt tgcgccccgc aacgacattt ataatgaacg tgaattgctc 540  
 aacagtatga acatttcgca gcctaccgta gtgtttgtth ccaaaaaggg gttgcaaaaa 600  
 attttgaacg tgcaaaaaaa attaccaata atccagaaaa ttattatcat ggattctaaa 660  
 acggattacc agggatttca gtcgatgtac acgttcgta catctctct acctcccggg 720  
 tttaatgaat acgattttgt accagagtcc tttgatcgtg acaaaacaat tgcactgata 780  
 atgaattcct ctggatctac tgggttacct aagggtgtgg cccttccgca tagaactgcc 840  
 tgcgtcagat tctcgcacgc cagagatcct atttttggca atcaaatcat tccggatact 900  
 gcgattttta gtgttgttcc attccatcac ggttttggaa tgthttactac actcggatat 960  
 ttgatattgt gatttcgagt cgtcttaatg tatagatttg aagaagagct gthttttacga 1020  
 tcccttcagg attacaaaaa tcaaagtgcg ttgctagtac caaccctatt ttcattcttc 1080  
 gccaaaagca ctctgattga caaatacgat ttatctaatt tacacgaaat tgcttctggg 1140  
 ggcgcacctc tttcgaaaaga agtcggggaa gcggttgcaa aacgcttcca tcttccaggg 1200  
 atacgacaag gatatgggct cactgagact acatcagcta ttctgattac acccgagggg 1260  
 gatgataaac cgggcgcggt cggtaaagt ttccatttt ttgaagcga ggttgtggat 1320  
 ctggataccg ggaaaacgct gggcgthaat cagagaggcg aattatgtgt cagaggacct 1380  
 atgattatgt ccggttatgt aaacaatccg gaagcgacca acgcttcat tgacaaggat 1440  
 ggatggctac attctggaga catagcttac tgggacgaag acgaacctt cttcatagtt 1500  
 gaccgcttga agtctthaat taaatacaaa ggatatacagg tgccccccgc tgaattggaa 1560  
 tcgatattgt tacaacaccc caacatcttc gacgcggggc tggcaggtct tcccagcat 1620  
 gacgccggtg aacttcccgc cgccgttgtt gthtttgagc acggaaagac gatgacggaa 1680  
 aaagagatcg tggattacgt cgccagtcaa gtaacaaccg cgaaaaagt ggcgcggagga 1740  
 gttgtgtttg tggacgaagt accgaaaggt cttaccggaa aactcgacgc aagaaaaatc 1800

agagagatcc tcataaaggc caagaagggc ggaaagtcca aattggttta atttatactt 1860  
 agataagtat gtacttacag gtatatttct atgagatact gatgtataca tgcatgataa 1920  
 tatttaaacg gttattagt ccgattgtct tgtgcgataa tgacgttctt atcaaagcaa 1980  
 tacacttacc acctattaca tgggccaaga aatatttttc gaacttgttt agaatattag 2040  
 cacagagtat atgatgttat ccgtagatt atgcatgatt cattcctaca actttttcgt 2100  
 agcataagga ttaattactt ggatgccaat aaaaaaaaaa aagcgacata gcaaaaaaaaa 2160  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2220  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2242

<210> 7

<211> 2175

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

gggagatcct aagttttatt ttattttatt ttattttatt ttattttatt ttattttatt 60  
 ttattttatt ttattttacc atgacagtaa tgtataaagt ctgtaaagac ataaaacacg 120  
 taagtgaaac cgaagacgcc aaaaacataa agaaaggccc ggcgccattc tatectctag 180  
 aggatggaac cgctggagag caactgcata aggctatgaa gagatacgcc ctggttctctg 240  
 gaacaattgc ttttacagat gcacatatcg aggtgaacat cacgtacgcg gaatacttcg 300  
 aatgtccgt tcggttgcca gaagctatga aacgatatgg gctgaataca aatcacagaa 360  
 tcgtcgtatg cagtgaaaac tctcttcaat tctttatgcc ggtgttgggc gcgttattta 420  
 tcggagttgc agttgcgccc gcgaacgaca ttataatga acgtgaattg ctcaacagta 480  
 tgaacatttc gcagcctacc gtagtgtttg tttccaaaaa ggggttgcaa aaaattttga 540  
 acgtgcaaaa aaaattacca ataatccaga aaattattat catggattct aaaacggatt 600  
 accagggatt tcagtcgatg tacacgttcg tcacatctca tctacctccc ggttttaatg 660  
 aatacgattt tgtaccagag tcctttgatc gtgacaaaac aattgcactg ataataatgatt 720  
 cctctggatc tactgggta cctaagggtg tggccttcc gcatagaact gcctgcgtca 780  
 gattctcgca tgccagagat cctatTTTTG gcaatcaaat cattccggat actgcgattt 840  
 taagtgttgt tccattccat cacggttttg gaatgtttac tacactcgga tatttgatat 900  
 gtggatttcg agtcgtctta atgtatagat ttgaagaaga gctgttttta cgatcccttc 960  
 aggattacaa aattcaaagt gcgttgctag taccaacctt attttcattc ttcgcaaaa 1020  
 gcactctgat tgacaaatac gatttatcta atttacacga aattgcttct gggggcgcac 1080  
 ctctttcgaa agaagtcggg gaagcggttg caaacgctt ccattctcca gggatacgac 1140  
 aaggatatgg gctcaactgag actacatcag ctattctgat tacaccgag ggggatgata 1200  
 aaccgggccc ggtcggtaaa gttgttccat ttttgaagc gaaggttgat gatctggata 1260  
 ccgggaaaac gctgggctt aatcagagag gcgaattatg tgcagagga cctatgatta 1320  
 tgtccgttga tgtaaacaaat ccggaagcga ccaacgctt gattgacaag gatggatggc 1380  
 tacattctgg agacatagct tactgggacg aagacgaaca cttcttcata gttgaccgct 1440  
 tgaagtcttt aattaaatac aaaggatatac aggtggcccc cgctgaattg gaatcgatat 1500  
 tgttacaaca cccaacatc ttcgacgcgg gcgtggcagg tcttcccgac gatgacgccg 1560

---

gtgaacttcc	cgccgccgtt	gttgttttgg	agcacggaaa	gacgatgacg	gaaaaagaga	1620
tcgtggatta	cgtcgccagt	caagtaacaa	ccgcgaaaaa	gttgcgcgga	ggagttgtgt	1680
ttgtggacga	agtaccgaaa	ggtcttaccg	gaaaactcga	cgcaagaaaa	atcagagaga	1740
tcctcataaa	ggccaagaag	ggcggaaagt	caaattggtt	ttaatttata	cttagataag	1800
tatgtactta	caggtatatt	tctatgagat	actgatgtat	acatgcatga	taatatttaa	1860
acggttatta	gtgccgattg	tcttgtgcga	taatgacgtt	cctatcaaag	caatacactt	1920
accacctatt	acatgggcca	agaaaatatt	ttcgaacttg	tttagaatat	tagcacagag	1980
tatatgatgt	tatccgtag	attatgcatg	attcattcct	acaacttttt	cgtagcataa	2040
ggattaatta	cttggatgcc	aataaaaaaaaa	aaaaagcgac	atagcaaaaa	aaaaaaaaaaa	2100
aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	2160
aaaaaaaaaaa	aaaaaa					2175

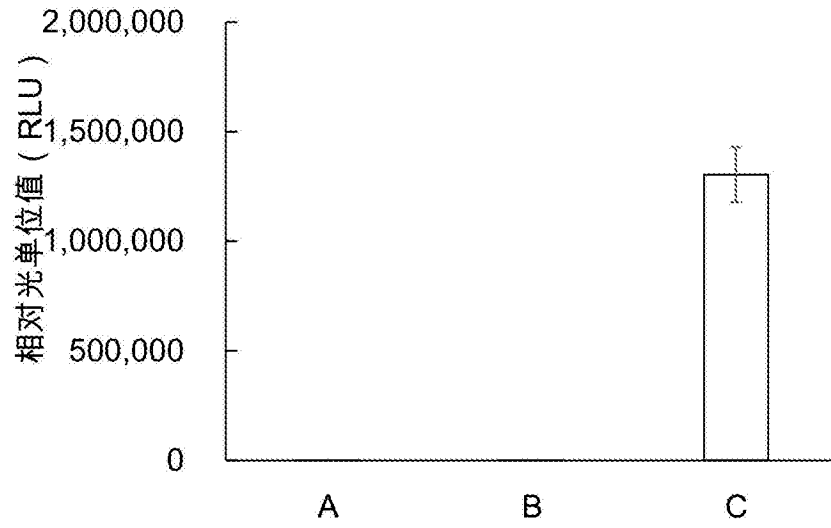


图1

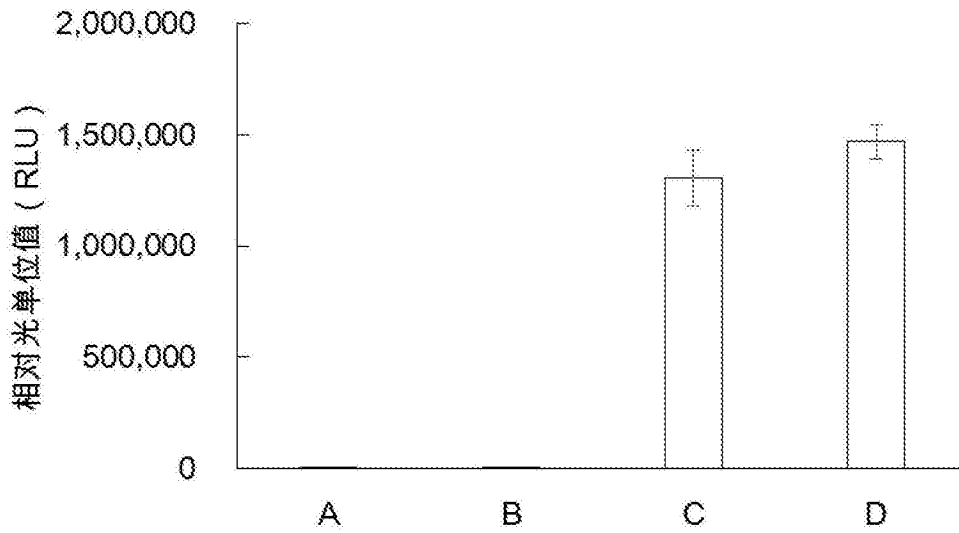


图2

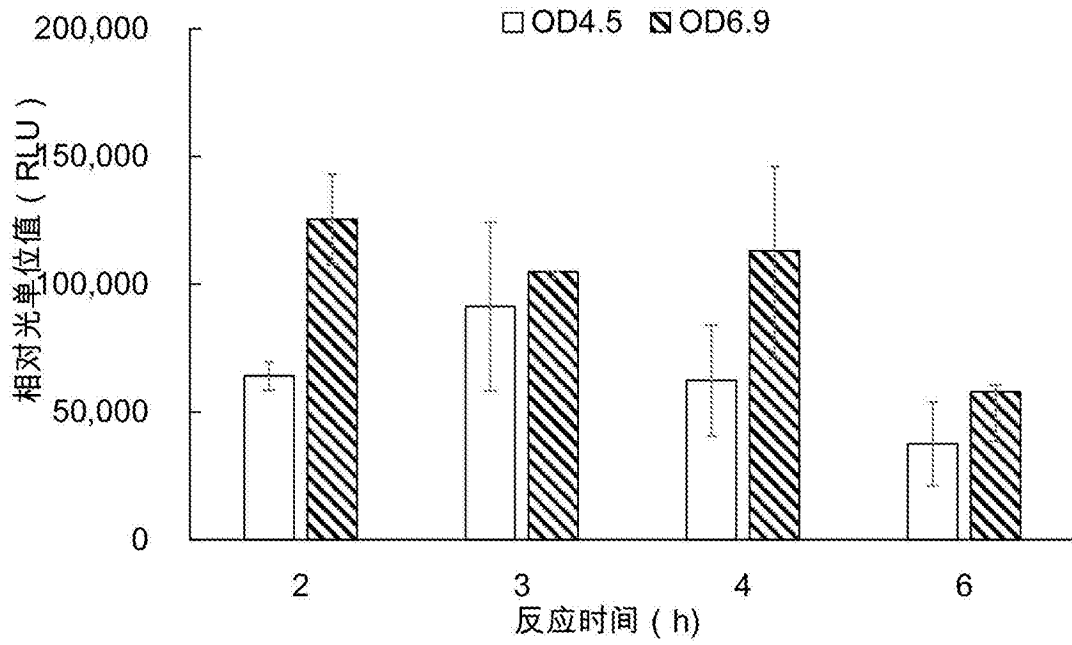


图3

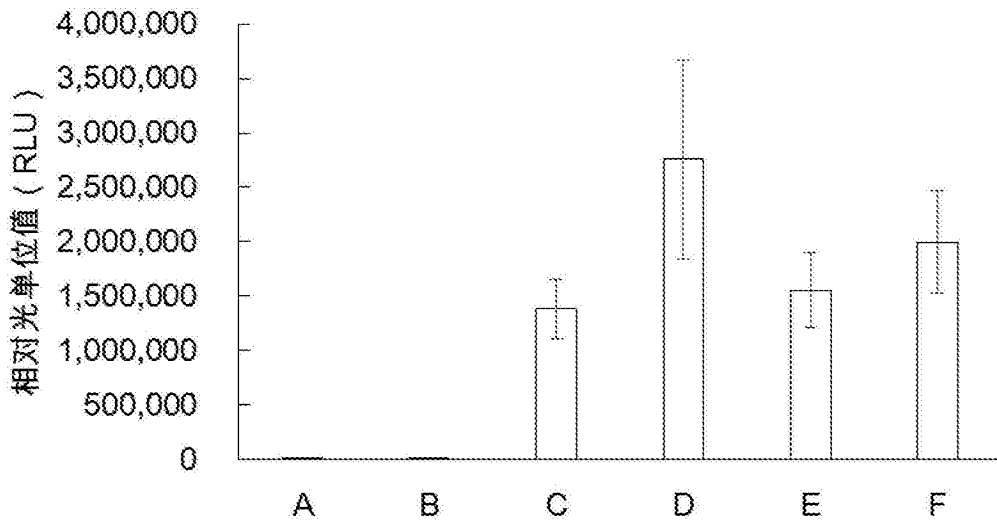


图4

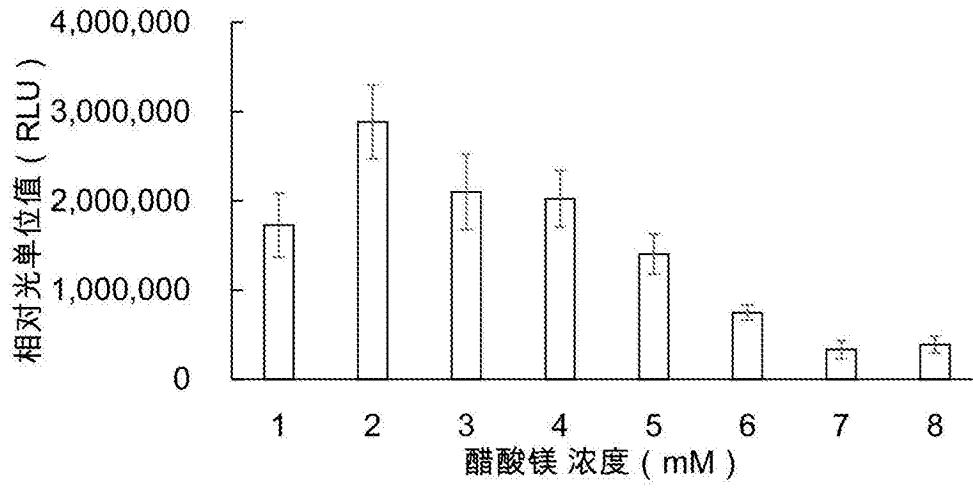


图5

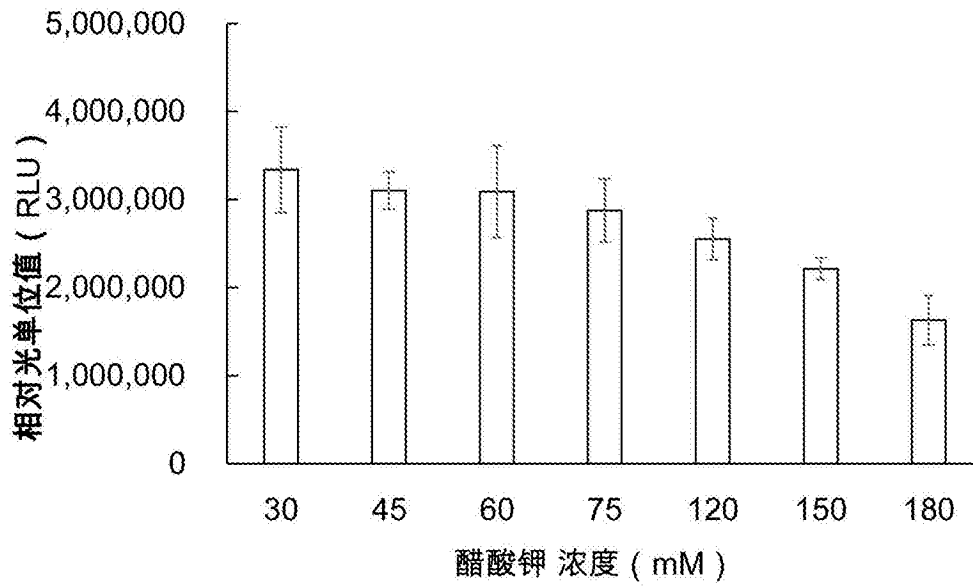


图6

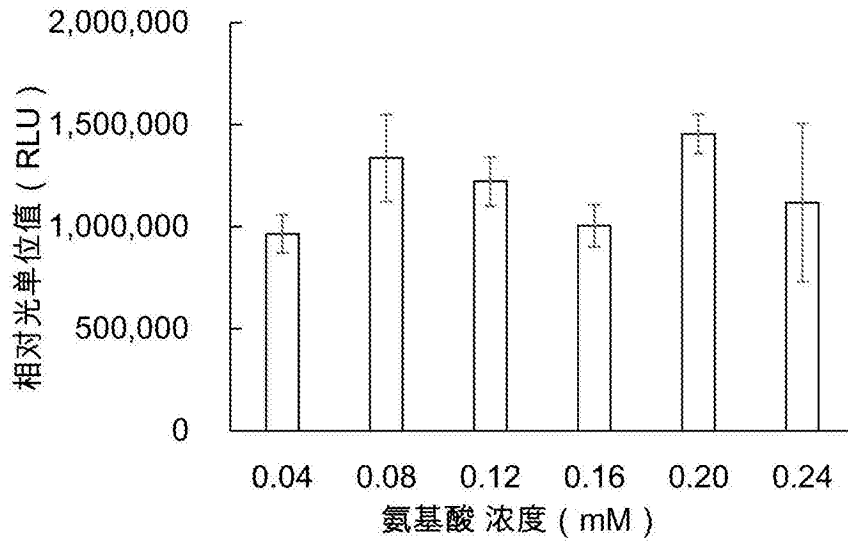


图7

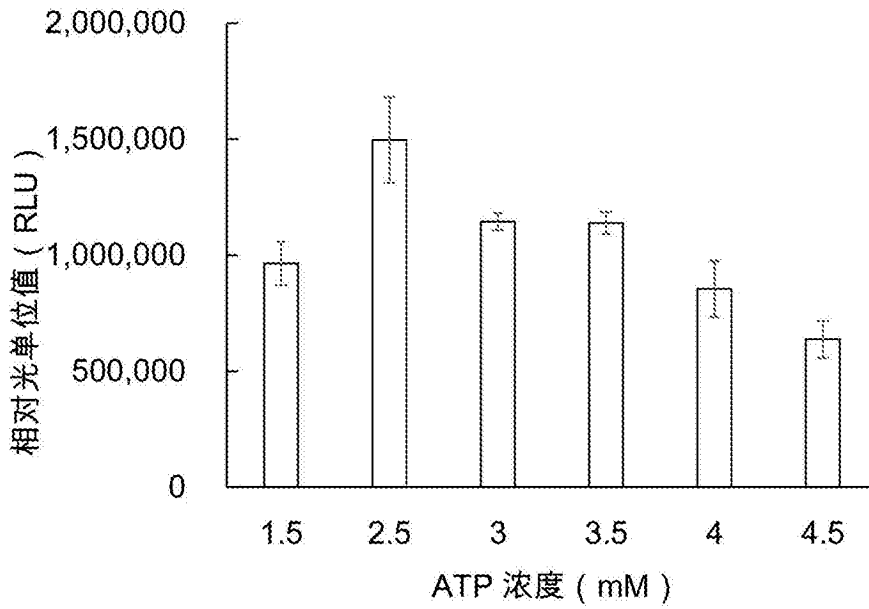


图8

名称	5'非翻译区	基因	3'非翻译区	Poly A	序列号
Ω-48A	omega	萤光素酶	无	48A	SEQ NO.1
Ω-90A	omega	萤光素酶	无	90A	SEQ NO.2
Ω-LT-50A	omega	萤光素酶	Lac Z 终止子	50A	SEQ NO.3
Ω-LT-70A	omega	萤光素酶	Lac Z 终止子	70A	SEQ NO.4
Ω-LT-90A	omega	萤光素酶	Lac Z 终止子	90A	SEQ NO.5
CrpV-Lt-90A	CrpV	萤光素酶	Lac Z 终止子	90A	SEQ NO.6
SITS2-Lt-90A	SITS2	萤光素酶	Lac Z 终止子	90A	SEQ NO.7

图9

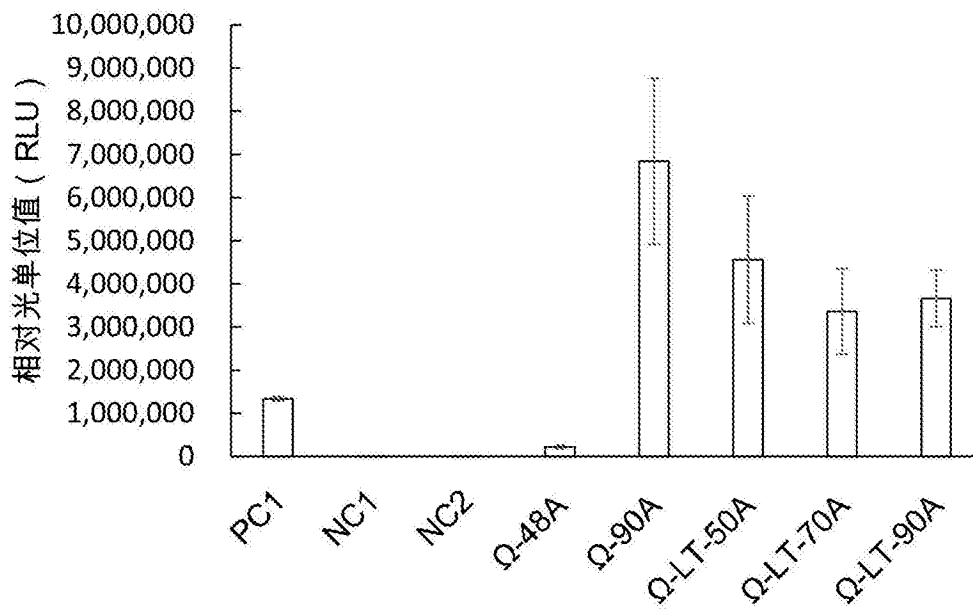


图10

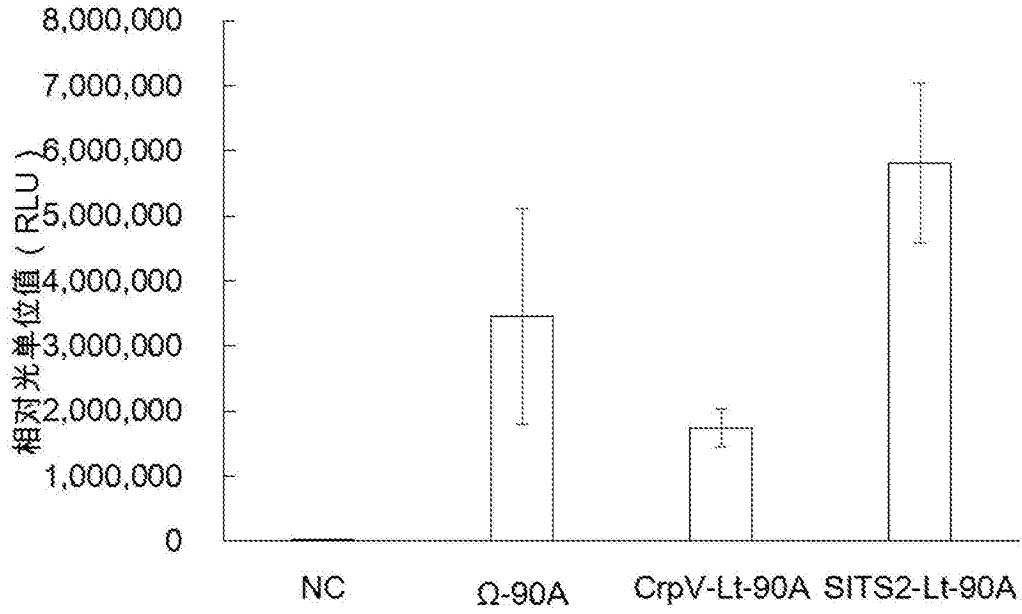


图11

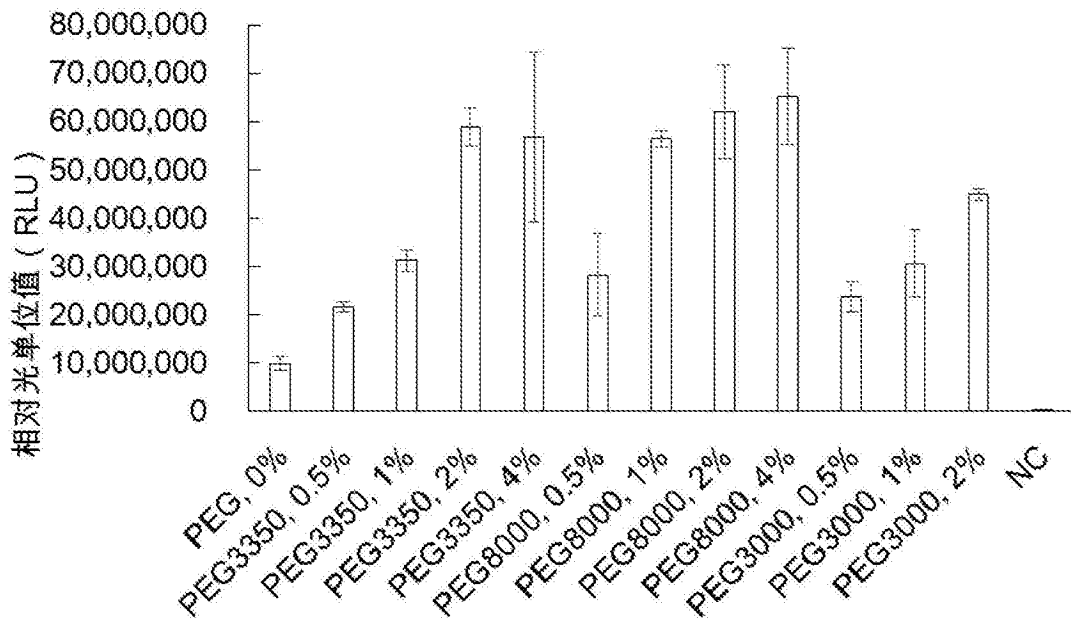


图12

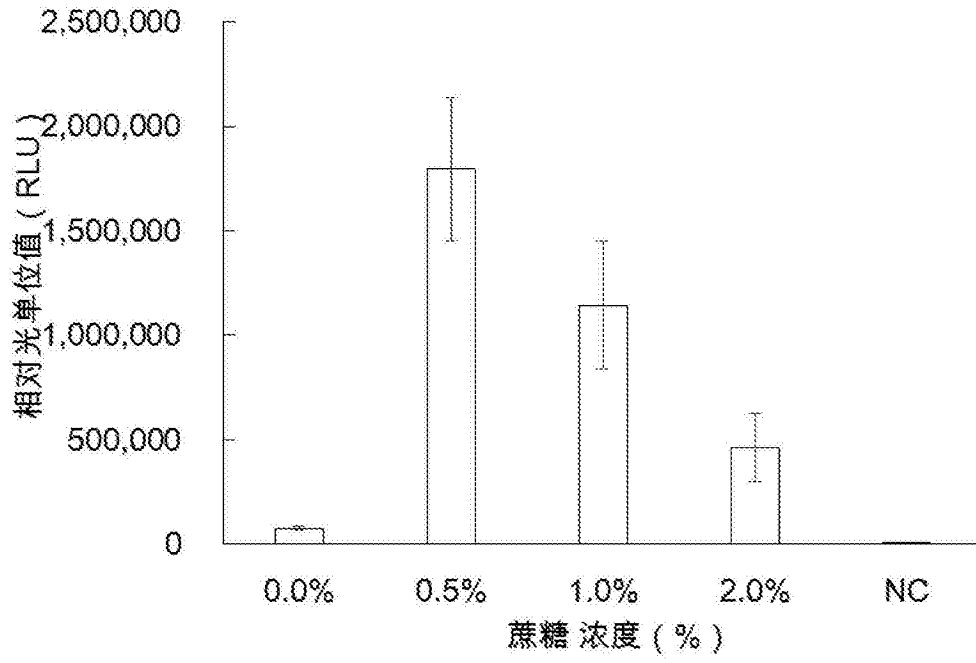


图13