



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106978349 A

(43)申请公布日 2017.07.25

(21)申请号 201610868691.6

(22)申请日 2016.09.30

(71)申请人 康码(上海)生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区蔡伦路781号
805室

(72)发明人 郭敏 符雷 柴智 刘帅龙 于雪

(51)Int. Cl.

C12N 1/06(2006.01)

C12P 21/00(2006.01)

C12R 1/645(2006.01)

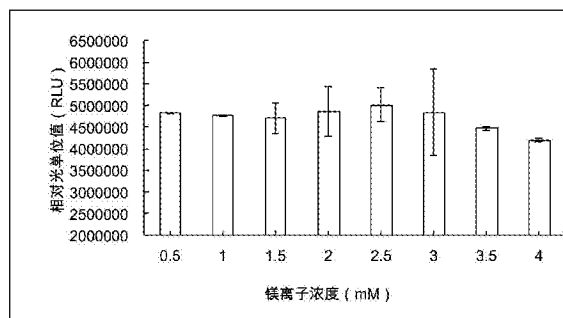
权利要求书2页 说明书10页
序列表2页 附图4页

(54)发明名称

一种体外蛋白质合成的试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种酵母细胞提取液的制备方法、酵母细胞提取液和利用所述的酵母细胞提取液在体外体系中合成蛋白质的方法,以及含有所述的酵母细胞提取液的试剂盒,该试剂盒可以用于体外体系中蛋白质合成,比传统方法简便;无需转化、培养、破碎;节省大量使用时间和成本;可表达的蛋白质种类多,不受蛋白毒性影响;可表达多种蛋白质复合物,无需37℃高温。另外,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,制备得到的酵母提取物具有蛋白质翻译后修饰的能力,适合大规模制备,具有工业生产的优势;采用真空冷冻干燥法把酵母细胞提取物制成冻干粉低温或常温保存,便于运输。



1. 一种体外蛋白质合成试剂盒中酵母细胞提取液的制备方法,具体包括以下几个步骤:

- a) 挑取酵母单菌落,接种于YPD培养基中;
- b) 在OD₆₀₀=3.0-6.9时,离心收获酵母细胞;
- c) 菌体收获后采用Buffer A 进行重悬,重悬2-4次;
- d) 菌体采用高压破碎或者搅拌机破碎;
- e) 把步骤d中收获的酵母细胞提取物进行离心2-4次,离心力在30000-100000× g;
- f) 离心后,取中间层的酵母细胞提取物,除去分子量不超过2 KDa的胞内组分,并将所得溶液浓缩,分装;
- g) 液氮速冻,-80℃保存;
- h) 或液氮速冻后,使用冷冻干燥机器冻干,制成水分<5%的干粉后,密闭低温或室温保存。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征是:所述酵母菌为乳酸克鲁维酵母。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征是:高压破碎时,压力值为500-1400 bar,菌体与Buffer A的比例为2 g : 1 mL。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征是:所述Buffer A由20-30 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾,100-200 mM醋酸钾,1-2 mM醋酸镁,2 mM二硫苏糖醇,0.5 mM苯甲基磺酰氟组成。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征是:搅拌机破碎,搅拌时间为8 min。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征是:用于体外蛋白合成的酵母细胞提取液,包括使用权利要求1中b-h任一项的酵母细胞提取物。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征是:酵母细胞提取物反复冻融后,不损失体外蛋白合成的活性。

8. 一种采用如权利要求1所述的酵母提取物的体外蛋白质合成的试剂盒,其特征是:所述试剂盒具有一体外蛋白质合成反应体系,该反应体系包括: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,鸟嘌呤核苷三磷酸,氨基酸混合物,磷酸肌酸,二硫苏糖醇,磷酸肌酸激酶,RNA酶抑制剂,阳性对照品,荧光素。

9. 根据权利要求8所述的体外蛋白质合成的试剂盒,其特征是:所述酵母提取物在体外蛋白质合成反应体系中所占体系为50-70 %。

10. 根据权利要求8所述的体外蛋白质合成的试剂盒,其特征是:所述体外蛋白质合成体系中含有22 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,30-240 mM醋酸钾,0.5-4.0 mM醋酸镁,0.75 mM腺嘌呤核苷三磷酸,0.1 mM鸟嘌呤核苷三磷酸,25 mM磷酸肌酸,1.7 mM二硫苏糖醇。

11. 根据权利要求8所述的体外蛋白质合成的试剂盒,其特征是:所述体外蛋白质合成体系中磷酸肌酸激酶的浓度为0.27 mg/mL,RNA酶抑制剂的浓度为200 U/mL。

12. 根据权利要求8所述的体外蛋白质合成的试剂盒,其特征是:所述体外蛋白质合成体系中的阳性对照品为萤火虫荧光素酶基因的mRNA,萤火虫荧光素酶基因的mRNA浓度在40-100 ng/μL,萤火虫荧光素酶基因的mRNA对应的DNA序列为SEQ ID No.1。

13. 根据权利要求8所述的体外蛋白质合成的试剂盒,其特征是:所述体外蛋白质合成

体系中的氨基酸混合物为下列20种氨基酸: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,20种氨基酸的浓度分别为0.04 mM。

14. 根据权利要求8所述的体外蛋白质合成的试剂盒,其特征是,所述体外蛋白质合成体系反应温度为20 °C,反应时间为4h。

一种体外蛋白质合成的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于体外蛋白合成(in vitro protein synthesis)的酵母细胞提取液的制备方法、酵母细胞提取液和利用所述的酵母细胞提取液在体外体系中合成蛋白质的方法,以及含有所述的酵母细胞提取液的试剂盒,该试剂盒可以用于体外体系中蛋白质合成,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 传统的蛋白表达是指通过细菌、真菌、植物细胞或动物细胞等表达外源基因的生物学技术。随着科学技术的发展,蛋白质相关的前沿领域逐渐兴起,体外蛋白合成系统应运而生,其是以外源mRNA或者DNA为模板,在RNA聚合酶及转录因子等组分作用下合成相应的mRNA,通过在体系内加入氨基酸、ATP和GTP完成蛋白质翻译的体外系统[1]。体外翻译系统内的组分和翻译条件可以根据需要进行适当的改变,可以并行检测多种基因模板,也可同时加入多个模板,可以研究多种蛋白质的复合物和之间的相互作用[2-3]。体外翻译系统也可以对基因产物进行特异性标记,产生特定改造的蛋白质产物,或便于在反应混合物中检测[4]。另外,体外翻译系统中表达蛋白质不需要先进行克隆,无需构建表达细胞宿主。因此体外蛋白合成系统是一种快速的蛋白质表达和鉴定系统。

[0003] 目前,已经商业化的体外蛋白表达系统有大肠杆菌系统(*E. coli* extract, ECE)[5]、兔网织红细胞(Rabbit reticulocyte lysate, RRL)[6]、麦胚(Wheat germ extract, WGE)[7]、昆虫(Insect cell extract, ICE)[8]和来源系统[9]。除此以外还有链霉菌Streptomycetaceae[10]、利什曼锥虫*Leishmania tarentolae*[11]、爪蟾卵母细胞*Xenopus laevis*[12]、拟南芥*Arabidopsis thaliana*[13]、家蚕*Bombyx mori* Linnaeus[14]等系统报道。其中,大肠杆菌系统由于其价格低、制备易、表达量高三大优点成为目前为止最普遍使用的系统。在其基础上构建了只包含最基本转录翻译功能的PURE系统,大大降低了非目标蛋白质的表达量[15]。相对于原核系统,大多数种类的真核细胞具有可以表达复杂蛋白以及实现一些翻译后修饰的优势[16, 19]。真核体外蛋白表达系统中WGE、RRL和ICE系统最为常见。WGE是用小麦胚芽制备而成[17-18],在真核系统中产量最高,但是缺乏糖基化等翻译后修饰手段。RRL和ICE系统具有异戊二烯化[19-20]、乙酰基化[21-22]、磷酸化[23]、信号肽和泛素化处理[24]和核糖基化[25]等翻译后修饰手段。总体而言,这些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、只适合一般实验室操作。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] 作为单细胞的真核生物,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[26]。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[27]。酵母也可作为制备体外翻译系统的原料。近年来,酿酒酵母体外翻译系统已被用来进行多种哺乳动物病毒的mRNA的翻译研究[28-29],呈现出与其它真核体外翻译系统类似的活性,而且酵母细胞,培养简单,操

作方便,繁殖迅速,成本低[29]。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[30]。乳酸克鲁维酵母是一种能够以乳糖作为其唯一的碳源和能源的酵母[31-32]。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、食品安全的级别及同时具有蛋白翻译后修饰的能力等[33-37]。其作为宿主系统表达药用蛋白也已显示出巨大的潜力[37-38]。因此工业乳酸克鲁维酵母体外翻译系统有望比其他翻译系统更适合成为研究基因表达和调控的理想工具。目前,克鲁维酵母体外蛋白合成系统尚不存在。

发明内容

[0005] 本发明提供一种体外蛋白质合成的试剂盒及其制备方法,以克服现有技术所存在的缺陷和不足。

[0006] 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的试剂盒。

[0007]

本发明所需要解决的技术问题,可以通过以下技术方案来实现:

作为本发明的第一方面,一种酵母提取物的制备方法,具体包括以下几个步骤:

- a) 挑取酵母单菌落,接种于YPD培养基中;
- b) 在OD₆₀₀=3.0-6.9时,离心收获酵母细胞;
- c) 菌体收获后采用Buffer A 进行重悬,重悬2-4次;
- d) 菌体采用高压破碎或者搅拌机液氮破碎;
- e) 把步骤d中收获的酵母细胞提取物进行离心2-4次,离心力在30000-100000× g;
- f) 离心后,取中间层的酵母细胞提取物,除去分子量不超过2 KDa 的胞内组分,并将所得溶液浓缩,分装;
- g) 液氮速冻,-80 °C保存;
- h) 或液氮速冻后,使用冷冻干燥机干燥,冻干粉低温或室温密闭保存。

[0008] 在本发明中,所述酵母菌为乳酸克鲁维酵母。

[0009] 其中,高压破碎时,压力值为500-1400 bar,菌体与Buffer A的比例为2 g : 1 mL。

[0010] 其中,所述Buffer A由20-30 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾,100-200 mM 醋酸钾,1-2 mM醋酸镁,2 mM二硫苏糖醇,0.5 mM苯甲基磺酰氟组成。

[0011] 其中,搅拌机液氮破碎时,搅拌时间为8 min。

[0012] 其中,用于体外蛋白质合成的酵母细胞提取液,包括使用上述步骤b-h任一项的酵母细胞提取液。

[0013] 作为本发明的第二方面,一种体外蛋白质合成的试剂盒,所述试剂盒包含一个体外蛋白质合成反应体系,该反应体系包括: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),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,阳性对照品,荧光素。

[0014] 其中,所述酵母提取物,在体外蛋白质合成反应体系中所占体系为50-70 %。

[0015] 其中,所述阳性对照品为萤火虫荧光素酶基因的mRNA,其浓度在40-100 ng/ μ L,其mRNA对应的DNA序列为SEQ ID NO.1。

[0016] 其中,所述体外蛋白质合成体系中含有22 mM、pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸,30-240 mM醋酸钾,0.5-4.0 mM醋酸镁,0.75 mM腺嘌呤核苷三磷酸,0.1 mM鸟嘌呤核苷三磷酸,25 mM磷酸肌酸,1.7 mM二硫苏糖醇。

[0017] 其中,所述体外蛋白质合成体系中磷酸肌酸激酶的浓度为0.27 mg/mL,RNA酶抑制剂的浓度为200 U/mL。

[0018] 其中,所述体外蛋白质合成体系中的氨基酸混合物为下列20种氨基酸: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,20种氨基酸的浓度分别为0.04 mM。

[0019] 其中,所述体外蛋白质合成体系中的反应温度为20 $^{\circ}$ C,反应时间为4 h。

[0020]

本发明的有益效果是:本发明的试剂盒可以用于体外体系中蛋白质合成,比传统方法简便;无需转化、培养、破碎;节省大量使用时间和成本;可表达的蛋白质种类多,不受蛋白毒性影响;可表达多种蛋白质复合物,无需37 $^{\circ}$ C高温。另外,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,制备得到的酵母提取物具有蛋白质翻译后修饰的能力,适合大规模制备,具有工业生产的优势;采用真空冷冻干燥法把酵母细胞提取物制成冻干粉低温或常温保存,便于运输。

附图说明

[0021]

下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0022] 图1是体外蛋白质合成反应体系及对照的反应对比示意图。A为Buffer本身,B为未添加萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) mRNA的体外蛋白质合成反应体系,C为纯化的萤火虫荧光素酶(Fluc),D表示添加了萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc) mRNA体外蛋白质合成反应体系。反应条件为20 $^{\circ}$ C反应4 h。D的相对光单位值为1696150 RLU(Relative Light Unit, RLU),阳性对照C(15 ng萤火虫荧光素酶蛋白)活性为1063315 RLU。阴性对照无mRNA和buffer本身的活性分别为493 RLU和400 RLU。

[0023] 图2是温度和反应时间对体外蛋白质合成体系影响示意图。其中20 $^{\circ}$ C反应4 h效果最好,其相对光单位值为1856773 RLU。

[0024] 图3是不同菌液浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。A表示OD600=3.0,B表示OD600=6.9,从图上可以看出OD600=3.0-6.9范围内,其相对光单位值都不低于1000000 RLU。

[0025] 图4是不同破碎方法对体外蛋白质合成体系的影响示意图。其中,A表示搅拌机液氮破碎法得到酵母提取物的活性,其相对光单位值为1832815 RLU;B表示高压破碎法得到酵母提取物的活性,其相对光单位值为2007917;C为纯化的萤火虫荧光素酶(Fluc),阳性对照C(15 ng萤火虫荧光素酶蛋白,Fluc)活性为1063516 RLU。比较高压破碎法和搅拌机破碎法,相对光单位值都在1500000 RLU以上,说明这两种方法都适合制备酵母细胞提取物。

[0026] 图5不同冻融次数对体外蛋白质合成体系的影响示意图。酵母细胞提取物在反复冻融1-5次后,其相对光单位值都在1000000 RLU以上,说明反复冻融对酵母细胞提取物的活性影响不大。

[0027] 图6是醋酸钾浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。效果最好的为180 mM醋酸钾,其相对光单位值达3215297 RLU,同时也可以从图上看岀醋酸钾浓度在30-240 mM范围内,其相对光单位值都不低于100000 RLU。

[0028] 图7是醋酸镁浓度对体外蛋白质合成体系的影响示意图。效果最好的为2.5 mM醋酸镁,其相对光单位值达5012509 RLU,同时也可以从图上看岀醋酸镁浓度在0.5-4.0 mM区间里,其相对光单位值都不低于4000000 RLU。

[0029] 图8酵母提取物不同保存方法对体外蛋白质合成体系的影响示意图。A表示采用液态低温保存方法,其相对光单位值为4210138 RLU;B为冻干粉保存方法,其相对光单位值为5323377 RLU;C为纯化的萤火虫荧光素酶(Fluc),阳性对照C(15 ng萤火虫荧光素酶蛋白,Fluc)活性为1064682 RLU。说明酵母细胞提取物采用真空冷冻干燥法制备冻干粉进行保存,再加水溶解不影响活性。

具体实施方式

[0030]

以下结合具体实施例和附图,对本发明作进一步的详细说明,但下述的实施例并非用于限定本发明的保护范围。实施本发明的过程、条件、试剂、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制内容。

[0031] 本发明中酵母以乳酸克鲁维酵母为例,但不以此为限。

[0032] 一.实施例

实施例1: 体外蛋白质合成细胞提取物的高压制备法

1.1挑取乳酸克鲁维酵母(菌种编号ATCC 8585)单菌落,接种于50 mL YPD培养基中(装液量为20%,下同),YPD培养基的成分为:1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖,30℃、200 rpm,培养24 h;

1.2按1%的接种量把上述菌液接种到500 mL YPD培养基中,30℃、200 rpm,当OD600=3.0-6.9时,4℃离心收获酵母细胞菌体;

1.3上述菌体采用预冷的Buffer A进行重悬,重悬3次。Buffer A组成为:25 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾,150 mM醋酸钾,1.5 mM醋酸镁,2 mM二硫苏糖醇,0.5 mM苯甲基磺酰氟;

1.4高压破碎,压力值采用1400 bar,菌体与Buffer A的比例为2 g : 1 mL;

1.5把步骤1.4中收获的酵母细胞提取物进行离心2次,离心力在30000×g;

1.6离心后,取中间层的酵母细胞提取物,透析除去分子量低于2 KDa的胞内组分,并将所得溶液浓缩,分装。

[0033] 1.7液氮速冻,-80℃保存。

[0034]

实施例2: 体外蛋白质合成细胞提取物的搅拌机液氮制备法

2.1挑取乳酸克鲁维酵母(菌种编号ATCC 8585)单菌落,接种于50 mL YPD培养基中(装

液量为20%，下同)，YPD培养基的成分为：1% 酵母提取物，2% 蛋白胨，2% 葡萄糖，30℃、200 rpm，培养24 h；

2.2按1%的接种量把上述菌液接种到500 mL YPD培养基中，30℃、200 rpm，当OD₆₀₀=3.0-6.9时，4℃离心收获酵母细胞菌体；

2.3上述菌体采用预冷的Buffer A进行重悬，重悬3次。Buffer A组成为：25 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾，150 mM醋酸钾，1.5 mM醋酸镁，2 mM二硫苏糖醇，0.5 mM苯甲基磺酰氟；

2.4采用搅拌机(electronic extractor, juicer)液氮破碎，在搅拌机中加入适量液氮，再加入菌体，搅拌8min；加入适量Buffer A溶解；

2.5把步骤2.4中收获的酵母细胞提取物进行离心2次，离心力在30000×g；

2.6离心后，取中间层的酵母细胞提取物，透析除去分子量低于2 kDa的胞内组分，并将所得溶液浓缩，分装；

2.7液氮速冻，-80℃保存。

[0035]

实施例3：体外蛋白质合成细胞提取物的冷冻干燥保存法

3.1 实施例1.6和实施例2.6中所得溶液，以0.5-10 mL分装，液氮速冻；

3.2使用冷冻干燥机(lyophilizer)，冷冻干燥。待样品制成干粉后(<5%水分)，密闭低温或室温保存；

3.3冷冻干燥的样品，加入水至冻干前同等体积；

3.4摇动溶解后，即可使用。

[0036]

实施例4：无细胞体外蛋白质合成体系

4.1体外蛋白质合成体系辅料的配制：220 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸，1 M醋酸钾，1 M醋酸镁，4.5 mM腺嘌呤核苷三磷酸，0.6 mM鸟嘌呤核苷三磷酸，20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，20种氨基酸的浓度均为1.0 mM，150 mM磷酸肌酸，10.2 mM二硫苏糖醇，3.24 mg/mL磷酸肌酸激酶，4 U/μL RNA酶抑制剂；

4.2体外蛋白质合成体系的配制：加入终浓度为22 mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸，30-240 mM醋酸钾，0.5-4.0 mM醋酸镁，0.75 mM腺嘌呤核苷三磷酸，0.1 mM鸟嘌呤核苷三磷酸，20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，20种氨基酸的浓度全部为0.04 mM，25 mM磷酸肌酸，1.7 mM二硫苏糖醇，0.27 mg/mL磷酸肌酸激酶，200 U/mL RNA酶抑制剂；加入萤火虫荧光素酶基因的mRNA；加入70%体积的细胞提取物；

4.3体外蛋白质合成反应：将上述反应体系放置在20-30℃环境中2-6 h，静置反应；

4.4 活性测定：反应结束后，加入底物荧光素(luciferine)，使用Envision 2120多功能酶标仪(Perkin Elmer)，读数检测萤火虫荧光素酶活性，如图1-图8所示。

[0037]

二.实验结果

1.阳性对照和阴性对照的确定

从图1可以看出,在反应条件为20 °C反应4 h的情况下,体外蛋白质合成反应体系的相对光单位值为1696150 (Relative Light Unit, RLU),萤火虫荧光素酶(Fluc)反应体系作为阳性对照,其相对光单位值为1063315 RLU,其中萤火虫荧光素酶的浓度为1 µg/mL,无mRNA和buffer本身阴性对照的活性分别为 493 RLU和 400 RLU。

[0038] 2. 温度和反应时间对体外蛋白质合成体系的影响

从图2可以看出,在相同的反应时间里,采用20 °C进行反应的体系优于25 °C和30 °C,采用20 °C作为反应温度,在2-6 h中,4 h的时候到达最高值,最高值的相对光单位值为1856773 RLU。综上所述,该反应体系在20 °C反应4 h可以达到最好效果。

[0039] 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反应不同时长会有一些的差异,采用20 °C作为反应温度,在2-6 h中,OD600=3.0的酵母提取物在4 h的时候到达最高值,最高值的相对光单位值为1856773 RLU。OD600=6.9的酵母提取物在2 h的时候到达最高值,最高值的相对光单位值为2218570 RLU。同时,从图3可以看出,采用OD600=3.0-6.9的酵母菌制备得到的提取物,其相对光单位值都不低于1000000 RLU。

[0040] 4. 不同破碎方法对体外蛋白质合成体系的影响

对酵母细胞采用高压破碎法和搅拌机液氮破碎法,结果如图4所示,采用搅拌机液氮破碎方法得到的酵母提取物相对光单位值为1832815 RLU,采用高压破碎法得到的酵母提取物相对光单位值为2007917 RLU,萤火虫荧光素酶(Fluc)反应体系作为阳性对照,其相对光单位值为1063516 RLU,其中萤火虫荧光素酶的浓度为1 µg/mL。比较高压破碎法和搅拌机液氮破碎法,相对光单位值都在1500000 RLU以上,说明这两种方法都适合制备酵母细胞提取物。

[0041] 5. 酵母提取物不同冻融次数对体外蛋白质合成体系的影响

对保存在-80 °C的酵母细胞提取物进行反复冻融后,检测其对体外蛋白质合成体系的影响,结果如图5所示,从图5可以看出,酵母细胞提取物在反复冻融1-5次后,其相对光单位值都在1000000 RLU以上,说明反复冻融对酵母细胞提取物的活性影响不大。

[0042] 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、60、90、120、150、180、210和240 mM的醋酸钾,20 °C反应4 h,结果如图6所示,从图6可以看出,醋酸钾浓度在30-240 mM区间里,其相对光单位值都不低于1000000 RLU,效果最好的为180 mM醋酸钾,其相对光单位值达3215297 RLU。

[0043] 7. 醋酸镁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0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0 mM的醋酸镁,20 °C反应4 h,结果如图7所示,从图7可以看出,醋酸镁浓度在0.5-4.0 mM区间里,其相对光单位值都不低于4000000 RLU,效果最好的为2.5 mM醋酸镁,其相对光单位值高达5012509 RLU。

[0044] 8. 酵母提取物不同保存方法对体外蛋白质合成体系的影响

酵母细胞提取物除了采用低温液态的方法外,还可以采用真空冷冻干燥法把酵母细胞提取物制成冻干粉(<5% 水分)低温或常温保存,比较液态低温保存和冻干粉保存对体外蛋白质合成体系的影响,结果如图8所示,从图8上可以看出,低温液态保存的相对光单位值为4210138 RLU,冻干粉复溶的相对光单位值为5323377 RLU,萤火虫荧光素酶(Fluc)反应体系作为阳性对照,其相对光单位值为106482 RLU,其中萤火虫荧光素酶的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。冻干粉低温保存的活性没有比液态低温保存的方法低,说明酵母细胞提取物也可以采用真空冷冻干燥法制备冻干粉进行保存。

[0045] 以上对本发明的具体实施方式进行了说明,但本发明并不以此为限,只要不脱离本发明的宗旨,本发明还可以有各种变化。

[0046] 参考文献

1.D Craig, MT Howell, CL Gibbs, T Hunt, RJ Jackson, Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Research*, 1992.20 (19): p.4987-95.

2.Goshima, N., et al., Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nature Methods*, 2008.5 (12):p. 1011-1017.

3.He, M. and M.J. Taussig, Rapid discovery of protein interactions by cell-free protein technologies. *Biochemical Society Transactions*, 2007. 35 (5): p. 962-5.

4.F Xian, S Li, S Liu,Rapid biosynthesis of stable isotope-labeled peptides from a reconstituted in vitro translation system for targeted proteomics. *Methods in Enzymology*, 2015.565:p.347-366.

5. Kim, D.M., et al., A Highly Efficient Cell-Free Protein Synthesis System from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1996. 239 (3): p. 881-6.

6. Jackson, R.J. and T. Hunt, Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods in Enzymology*, 1983. 96 (6): p. 50-74.

7.Erickson, A.H. and G. Blobel, Cell-free translation of messenger RNA in a wheat germ system . *Methods in Enzymology*, 1983. 96 (6): p. 38-50.

8. Ezure, T., et al., Cell-Free Protein Synthesis System Prepared from Insect Cells by Freeze-Thawing. *Biotechnology Progress*, 2006. 22 (6): p. 1570-7.

9.Mikami, S., et al., A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expression & Purification*, 2008. 62 (2): p. 190-198.

10.Lee, K.Y., et al., A cell-free protein synthesis system derived from the extract of *S treptomyces venezuelae*. *Journal of Biotechnology*, 2010. 150 (6): p. 528.

- 11.Kovtun, O., et al., Leishmania cell-free protein expression system. *Methods*, 2011. 55(1): p. 58-64.
- 12.Pratt, C.A. and K.L. Mowry, Preparation of a highly active cell-free translation system from immature *Xenopus laevis* oocytes. *Methods*, 2010. 51(1): p. 101-105.
- 13.Murota, K., et al., Arabidopsis cell-free extract, ACE, a new in vitro translation system derived from Arabidopsis callus cultures. *Plant & Cell Physiology*, 2011. 52(8): p. 1443-53.
- 14.Wang H., et al., High yield exogenous protein HPL production in the *Bombyx mori* silk gland provides novel insight into recombinant expression systems. *Scientific Reports*, 2015.5:13839.
- 15.Ohashi, H., et al., A highly controllable reconstituted cell-free system—a breakthrough in protein synthesis research. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010. 11(3): p. 267-71.
- 16.Chang, H.C., et al., De novo Folding of GFP Fusion Proteins: High Efficiency in Eukaryotes but Not in Bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 2005. 353(2): p. 397-409.
- 17.Madin, K., et al., A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. 97(2): p. 559-64.
- 18.Takai, K., T. Sawasaki, and Y. Endo, Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nature Protocol*, 2010. 5(2): p. 227-38.
- 19.Hancock, J.F., Reticulocyte lysate assay for in vitro translation and posttranslational modification of Ras proteins. *Methods in Enzymology*, 1995. 255(3): p. 60-5.
- 20.Suzuki, T., et al., Protein prenylation in an insect cell-free protein synthesis system and identification of products by mass spectrometry. *Proteomics*, 2007. 7(12): p. 1942-50.
- 21.Gibbs, P.E.M., D.C. Zouzas, and I.M. Freedberg, Differential post-translational modification of human type I keratins synthesized in a rabbit reticulocyte cell-free system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1985. 824(824): p. 247-55.
- 22.Suzuki, T., et al., N-Terminal protein modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 2006. 6(16): p. 4486-95.
- 23.Safer, B. and R. Jagus, Control of eIF-2 phosphatase activity in rabbit reticulocyte lysate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

1979. 76(3): p. 1094-8.

24.Suzuki, T., et al., Preparation of ubiquitin-conjugated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. *Journal of Biotechnology*, 2010. 145(1): p. 73-78.

25.Iglewski B H, Liu P V, Kabat D. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A:adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. *Infection & Immunity*, 1977. 15(1): 138-44.

26.Rothblatt, J.A. and D.I. Meyer, Secretion in yeast: Reconstitution of the translocation and glycosylation of α -factor and invertase in a homologous cell-free system. *Cell*, 1986. 44(4): p. 619-28.

27.Routledge, S.J., et al., The synthesis of recombinant membrane proteins in yeast for structural studies. *Methods*, 2015. 95: p. 26-37.

28.Wang, X., et al., An optimized yeast cell-free system: Sufficient for translation of human papillomavirus 58 L1 mRNA and assembly of virus-like particles. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2008. 106(1): p. 8-15.

29.Xiao, W., et al., Translational comparison of HPV58 long and short L1 mRNAs in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell-free system. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2010. 110(1): p. 58-65.

30.AJJV Ooyen., et al., Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fems Yeast Research*, 2006.6(3):p. 381-392.

31.Khattak, W.A., et al., Yeast cell-free enzyme system for bio-ethanol production at elevated temperatures. *Process Biochemistry*, 2014. 49(3): p. 357-364.

32.Valderrama, M.J., et al., A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy products. *Journal of Food Protection*, 1999. 62(2): p. 189-93.

33.Bonekamp,F.J., et al., On the safety of *Kluyveromyces lactis*: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1994.41: p.1-3.

34.Gellissen, G., et al., Application of yeasts in gene expressions studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and heterologous proteins. Recent attempts to improve protein secretion in *Kluyveromyces lactis* - a review. *Gene*,1997.190: p. 87-97.

35.Swinkels, B.W., Van Ooyen, A.J.J., Bonekamp, F.J., The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* , 1993.64: p. 187-201.

36.Van Ooyen, A.J., et al., Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res*, 2006.6: p. 381-392.

37. Ja, V.D.B., et al., *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio/technology*, 1990. 8 (2): p. 135-9.

38. Spohner, S.C., et al., *Kluyveromyces lactis* : An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 2016. 222: p. 104-116.

SEQUENCE LISTING

<110> 康码(上海)生物科技有限公司

<120> 一种体外蛋白质合成的试剂盒及其制备方法

<130>

<160> 1

<170>PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1776

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

ggatTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTACAATTACTATTT      60
acaattacaatggaggaagcgaagaatattaaaaaggggccccgcttttaccactc      120
gaggatggaaccgctggagagcaactgcataaggetatgaagagatagccctggttct      180
ggaacaattgcttttacagatgcacataatcgaggtgaacatcacgtacgcggaatactt      240
gaaatgtccgttcggttggcagaagctatgaaacgatatgggctgaatacaaatcacaga      300
atcgtcgatgcagtgaaaactctcttcaattctttatgccggtgttgggcgcgttattt      360
atcggagttgcagttgcgccccggaacgacatttataatgaacgtgaattgctcaacagt      420
atgaacatttcgcagcctaccgtagtgtttgtttccaaaaggggttgcaaaaaattttg      480
aacgtgcaaaaaaaattaccaataatccagaaaattattatcatggattctaaaacggat      540
taccagggatttcagtcgatgtacagttcgtcacatctcatctacctcccggttttaat      600
gaatacgaattttgtaccagagtcctttgatcgtgacaaaacaattgcaactgataatgaat      660
tcctctggatctactgggttacctaagggtgtggcccttcgcatagaactgcctgcgtc      720
agattctcgcgatgccagagatcctatTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTCGGATT      780
ttaagtgttgttccattccatcacggttttggaaatgtttactacactcggatatttgata      840
tgtggatttcgagtcgtcttaatgtatagatttgaagaagagctgtttttacgatccctt      900
caggattacaaaattcaaagtgcgttgcctagtagtaccacccattttcattcttcgcaaaa      960
agcactctgattgacaaaacgatttatctaatttacacgaaattgcttctgggggcgca      1020
cctctttcgaaagaagtcggggaagcgggttgcaaacgcttccatcttccagggatacga      1080
caaggatatgggctcactgagactacatcagctattctgattacaccgagggggatgat      1140
aaaccgggcgcggtcggtaaagtgttccatTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGAT      1200
accgggaaaacgctgggcgctaatcagagaggcgaattatgtgtcagaggacctatgatt      1260
atgtccggttatgtaacaatccggaagcgaccaacgccttgattgacaaggatggatgg      1320
ctacattctggagacatagcttactgggacgaagacgaacacttctcatagttgaccgc      1380
ttgaagtctttaataaaatacaaaaggatatcaggtggccccgctgaattggaatcgata      1440
ttgttacaacacccccaacatcttcgacgcgggcgtggcaggtcttcccacgatgacgcc      1500
ggatgaacttcccgcgcgctgttgttttggagcacggaaagacgatgacagagaaggaa      1560
attgtcgactatgtggcaagccaggtcactacggccaagaaattgcgtggtggtgtagta      1620

```

ttcgtcgatgaggttccaaagggactaacgggtaagctggatgctaggaagataaggaa	1680
attctaatacaagcgaaaaaggaggcaaatctaagttggtctaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1776

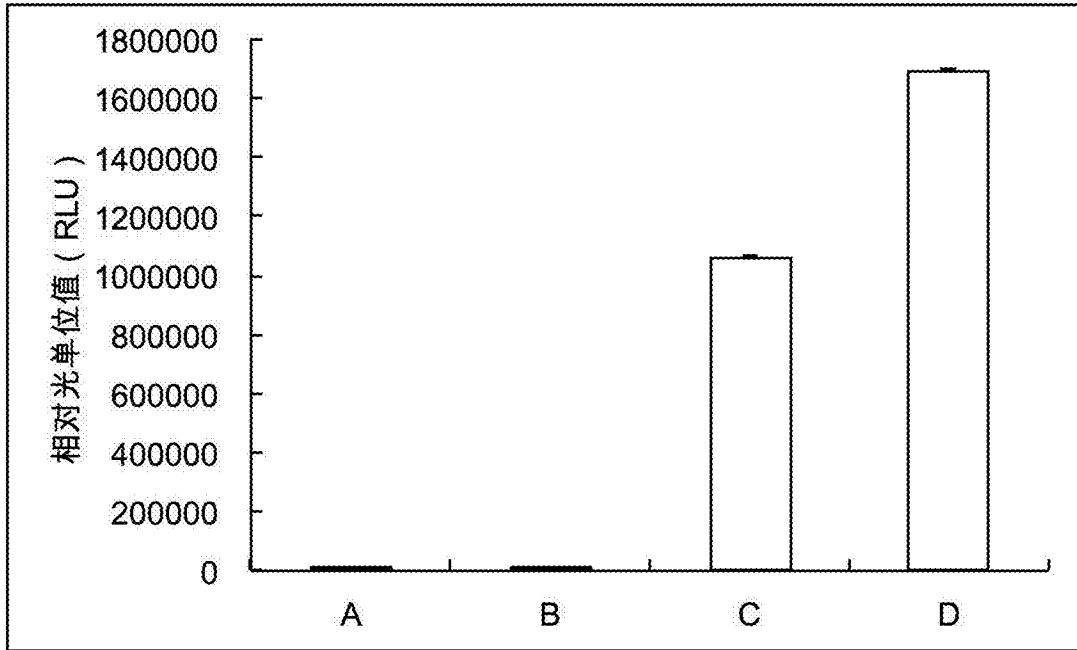


图1

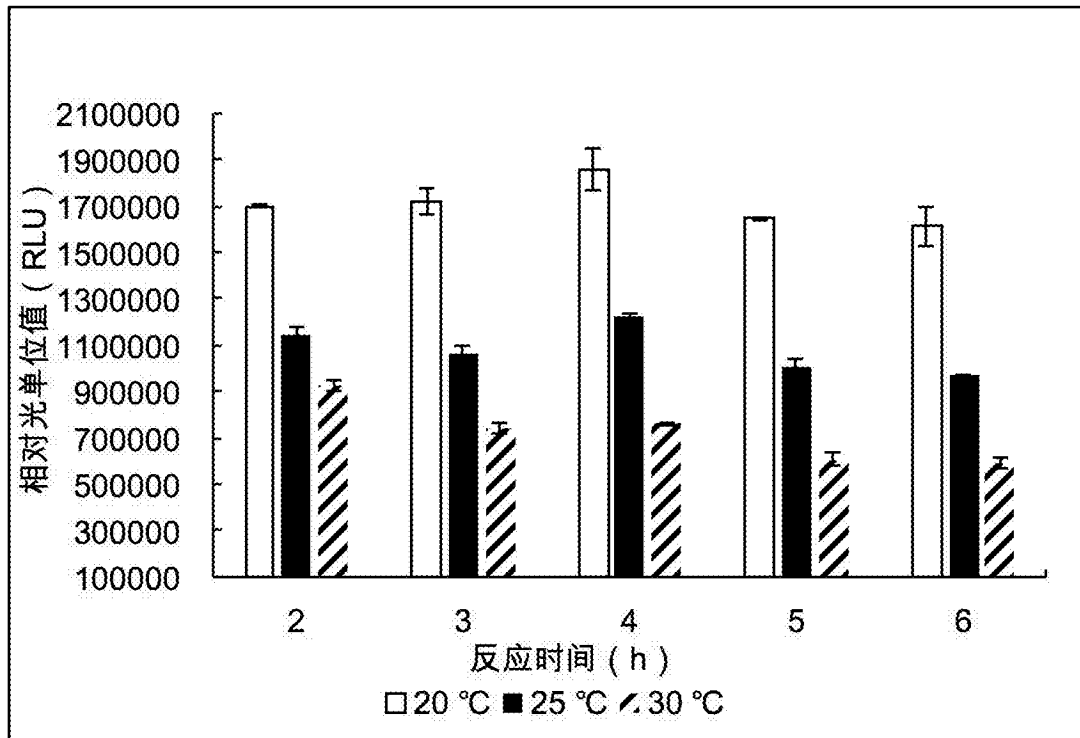


图2

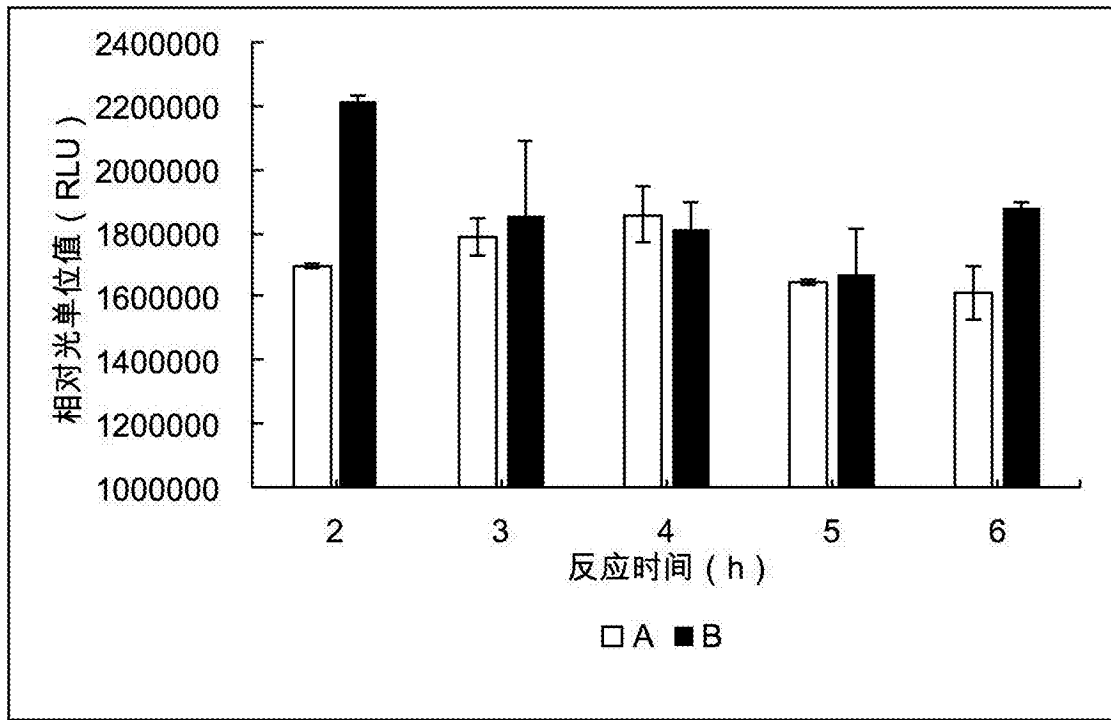


图3

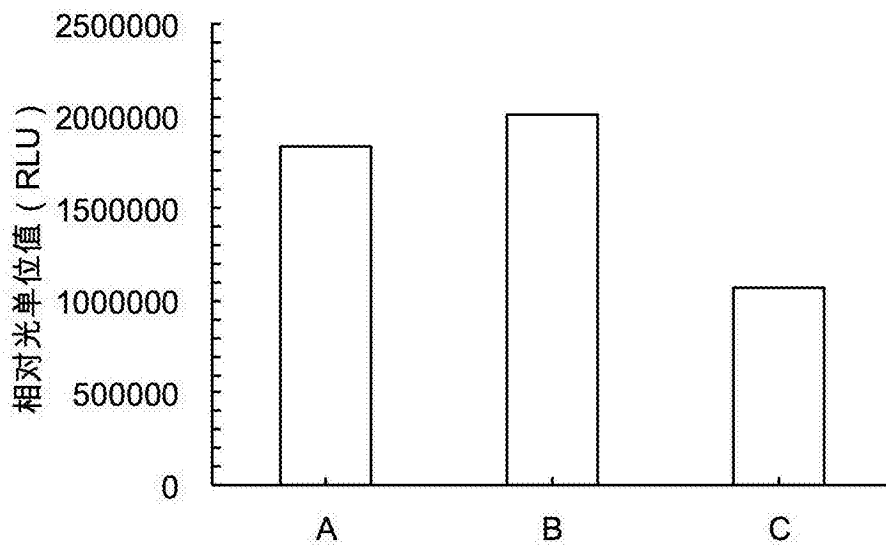


图4

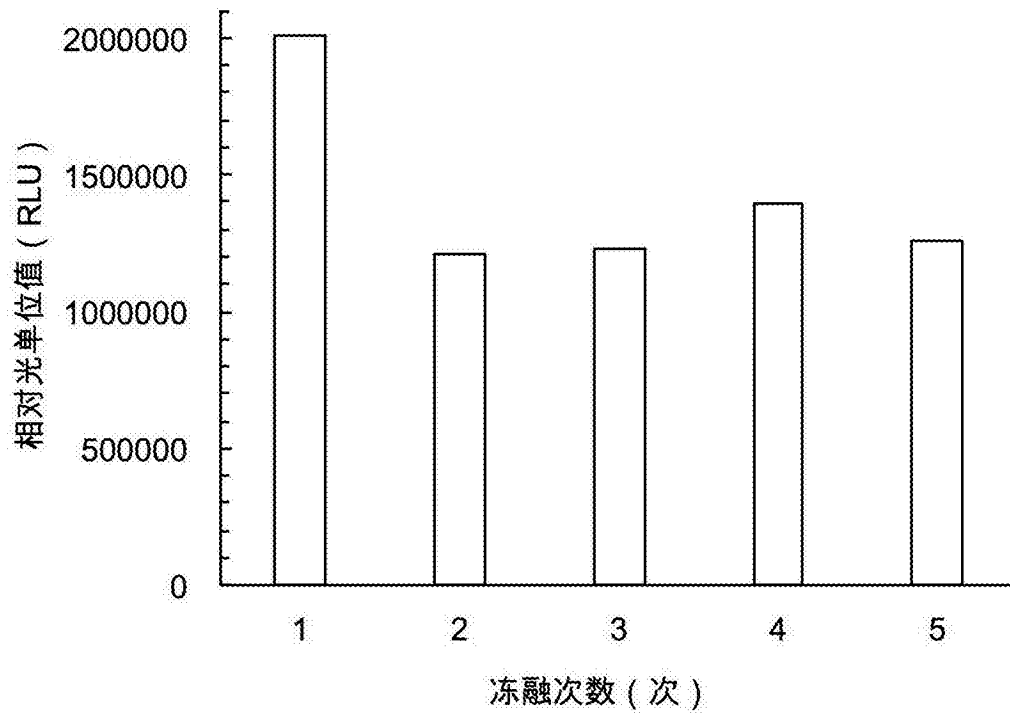


图5

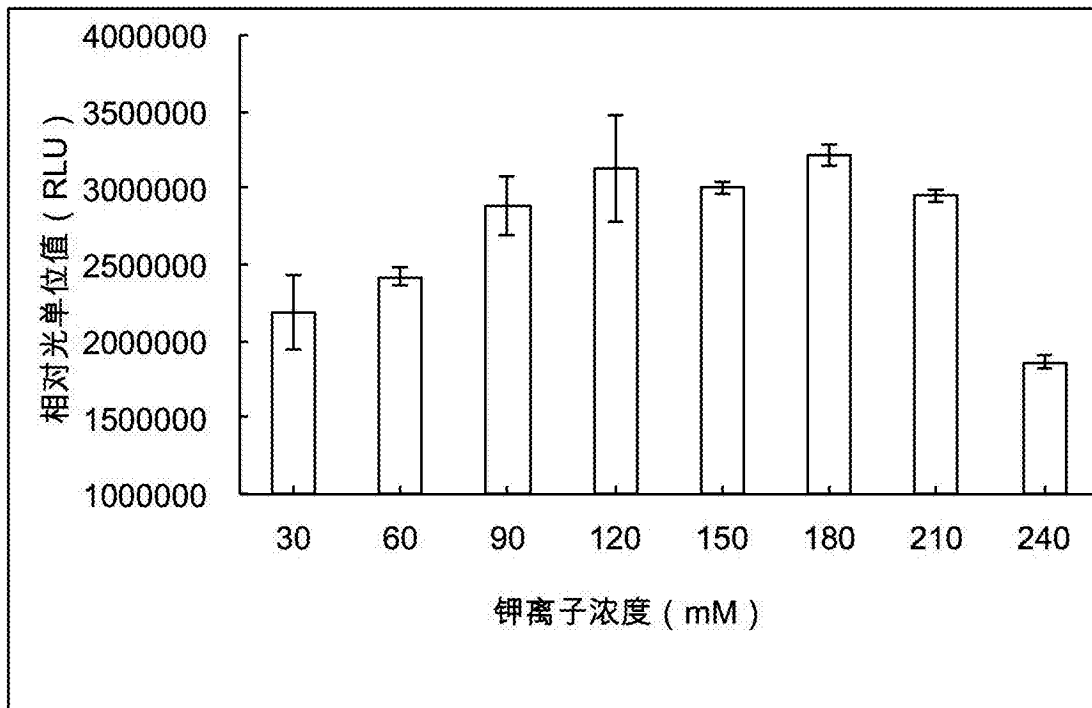


图6

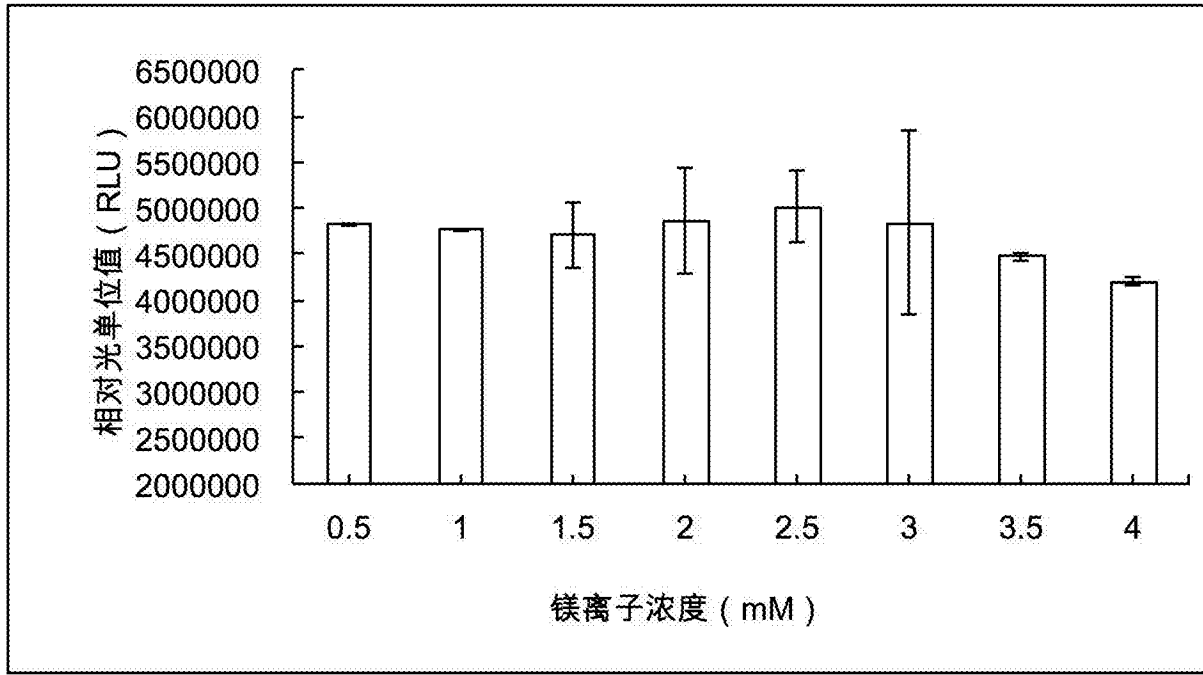


图7

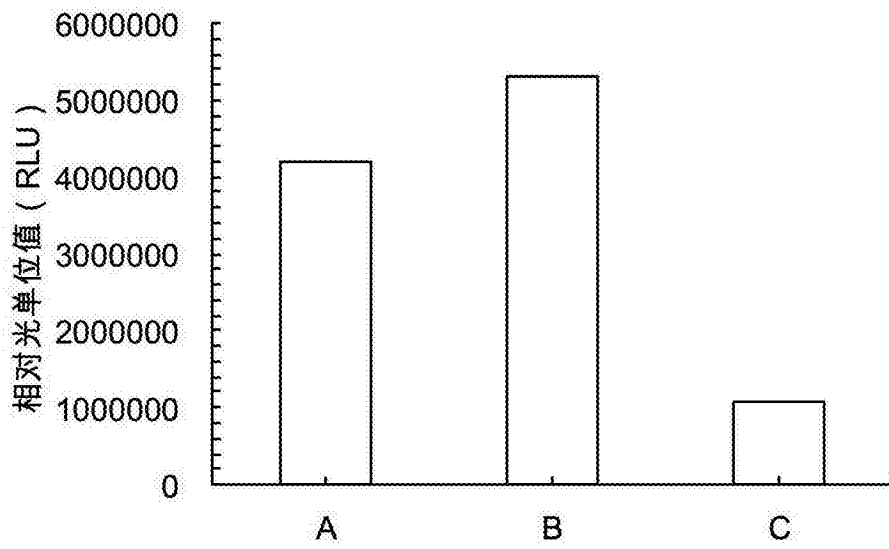


图8