(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110551785 A
(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201810559306.9

(22)申请日 2018.06.01

(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 周子鉴 于雪

(51)Int.Cl.
C12P 21/02(2006.01)

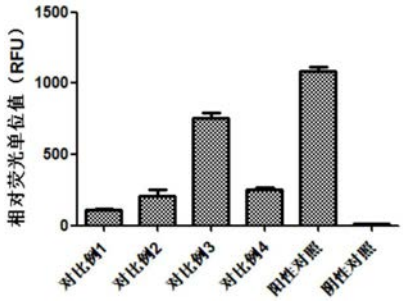
权利要求书3页 说明书15页 附图4页

(54)发明名称

一种用于体外蛋白质合成的无细胞冻干制剂、其制法和用途

(57)摘要

本发明提供了一种用于体外蛋白质合成的无细胞冻干制剂、其制法和用途，具体地，本发明提供的无细胞冻干制剂，在不需添加保护剂的情况下，可显著提高外源蛋白的合成活性。



CN 110551785 A

1.一种用于体外蛋白合成的无细胞冻干制剂,其特征在于,所述冻干制剂包括:

(a)细胞提取物;

(b)淀粉;和

(c)淀粉酶。

2.如权利要求1所述冻干制剂,其特征在于,所述冻干制剂还包括组分(d)葡萄糖。

3.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述淀粉酶包括γ淀粉酶。

4.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,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。

5.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,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、植物细胞、酵母细胞、或其组合。

6.如权利要求5所述的冻干制剂,其特征在于,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。

7.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述无细胞冻干制剂中,所述淀粉相对于所述细胞提取物的重量百分比为2-15%,较佳地,5-12%,更佳地,7-10%。

8.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述淀粉和淀粉酶的质量比为1.5×10^{7}:1-3×10^{8}:1,较佳地,2×10^{7}:1－2×10^{8}:1,更佳地,3×10^{7}:1－1.5×10^{8}:1。

9.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述冻干制剂中,所述葡萄糖相对于所述无细胞冻干制剂的重量百分比为0.5%-5%,较佳地,0.7%-4%,更佳地,0.9%-3.6%。

10.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述冻干制剂不包括保护剂(如冻干保护剂)。

11.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述的无细胞冻干制剂进行重构后,形成无细胞的体外蛋白质合成体系。

12.如权利要求11所述的冻干制剂,其特征在于,所述的重构按0.5-1.5冻干制剂:7-12g水(较佳地,0.7-1.2g冻干制剂:8-11g水,更佳地,0.8-1g冻干制剂:9-9.5g水)进行重构。

13.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述无细胞冻干制剂中,所述组分(a)的含量为10%－95%,较佳地,20%－80%,更佳地,40%－60%,以所述无细胞冻干制剂的总重量计。

14.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述无细胞冻干制剂还包括选自下组的一种或多种组分:

(c1)聚乙二醇;

(c2)用于合成RNA的底物;

(c3)用于合成蛋白的底物;

(c4)镁离子;

(c5)钾离子;

(c6)缓冲剂;

(c7)RNA聚合酶。

15.如权利要求1所述的冻干制剂,其特征在于,所述无细胞冻干制剂还包括(d1)外源

的用于指导蛋白质合成的DNA分子。

16.一种制备权利要求1所述的无细胞冻干制剂的方法,其特征在于,包括:

(i)提供一细胞提取物;

(ii)向所述的细胞提取物中添加淀粉;和淀粉酶,获得一混合物;和(iii)将所述的混合物进行冻干,获得经冻干的权利要求1所述的无细胞冻干制剂。

17.如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述步骤(ii)中,所述混合物中还包括葡萄糖。

18.如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述混合物中还包括选自下组的一种或多种组分:

(c1)聚乙二醇;

(c2)用于合成RNA的底物;

(c3)用于合成蛋白的底物;

(c4)镁离子;

(c5)钾离子;

(c6)缓冲剂;

(c7)RNA聚合酶。

19.如权利要求16所述的方法,其特征在于,所述步骤(ii)中,不需添加冻干保护剂。

20.一种物质的用途,其特征在于,所述的物质包括淀粉和淀粉酶,并且所述物质用于制备提高蛋白合成活性的试剂。

21.如权利要求20所述的用途,其特征在于,所述试剂还包括葡萄糖。

22.一种试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括容器以及位于所述容器中的权利要求1、2或14中任一项所述的无细胞冻干制剂。

23.一种表达待表达的外源蛋白的方法,其特征在于,包括:

(i)提供一体外蛋白质合成体系,其中所述的合成体系中含有淀粉;和淀粉酶;和

(ii)在适合表达蛋白的条件下,在所述外源蛋白的模板存在下,孵育所述体外蛋白质合成体系,从而表达所述的外源蛋白。

24.如权利要求23所述的方法,其特征在于,所述的合成体系中还含有葡萄糖。

25.如权利要求23所述的方法,其特征在于,所述合成体系中还含有选自下组的一种或多种组分:

(c1)聚乙二醇;

(c2)用于合成RNA的底物;

(c3)用于合成蛋白的底物;

(c4)镁离子;

(c5)钾离子;

(c6)缓冲剂;

(c7)RNA聚合酶。

26.一种体外蛋白合成体系,其特征在于,包括:

(a)细胞提取物;和

(b)淀粉;和

(c)淀粉酶。

27.如权利要求26所述的体外蛋白合成体系,其特征在于,所述体外蛋白合成体系还包括(d)葡萄糖。

28.如权利要求26所述的体外蛋白合成体系,其特征在于,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:

(c1)聚乙二醇;

(c2)用于合成RNA的底物;

(c3)用于合成蛋白的底物;

(c4)镁离子;

(c5)钾离子;

(c6)缓冲剂;

(c7)RNA聚合酶。

一种用于体外蛋白质合成的无细胞冻干制剂、其制法和用途

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无细胞冻干制剂、其制法和用途。

背景技术

[0002] 真空冷冻干燥技术是将湿物料或溶液在较低的温度(-10℃～-50℃)下冻结成固态，然后在真空(1.3～13帕)下使其中的水分不经液态直接升华成气态，最终使物料脱水的干燥技术。真空冷冻干燥全过程分为预冻、第一阶段升华干燥和第二阶段再干燥。

[0003] 目前，冷冻干燥方法是保持蛋白质活性的一个有效的、普遍应用的方法，有益于储存和运输，然而冷冻干燥过程存在着一些潜在的损伤危险[1]。在预冷、一次干燥、二次干燥和储存过程中，蛋白质可能存在一定程度的变性和损伤，保护剂通过减少蛋白质中的结合水含量，并且加强蛋白质和剩余结合水分子之间的相互作用力来防止蛋白质变性，不同浓度的保护剂对蛋白质的保护作用不同，因此制定可靠的冷冻干燥程序，采用优化的冷冻干燥过程，及优化的保护剂种类和浓度才能保证较稳定的蛋白制品的产出[2,3]。

[0004] 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已经开始得到广泛应用，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。

[0005] 无细胞表达体系的一个缺点是细胞提取物的保存，液体必须储存于-80℃，同时不能反复冻融，否则会严重影响细胞提取物合成蛋白的能力，将液态细胞提取物溶液置于常温，其蛋白合成能力会随时间增长而降低直至无活性[4]。

[0006] 然而目前仍未有冻干其他真核细胞，如酵母，无细胞表达体系的成功案例。

[0007] 目前，酵母体外蛋白合成系统的细胞提取物的冻干工艺未见报道，除了细胞提取物之外，体外蛋白质合成体系还含有氨基酸、NTP、缓冲液、RNA聚合酶等用于蛋白质合成的必要组分，其中有些组分的需要存储在低温或极低温环境，大大增加了存储、运输的难度和成本，而且使用时需要反复冻融，影响蛋白质合成的活性，操作不方便，不适用于大规模工业化生产和使用。

[0008] 因而，本领域迫切需要开发一种能够方便存储、运输及使用的，并且不需添加冻干保护剂、并适用于大规模生产的体外蛋白质合成体系的冻干制剂及工艺。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种能够方便存储、运输及使用的，并且不需添加冻干保护剂、并适用于大规模生产的体外蛋白质合成体系的冻干制剂及工艺。

[0010] 本发明第一方面提供了一种用于体外蛋白合成的无细胞冻干制剂，所述冻干制剂包括：

[0011] (a)细胞提取物;

[0012] (b)淀粉;和

[0013] (c)淀粉酶。

[0014] 在另一优选例中,所述冻干制剂还包括组分(d)葡萄糖。

[0015] 在另一优选例中,所述淀粉酶包括γ淀粉酶。

[0016] 在另一优选例中,所述淀粉酶还包括α淀粉酶。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 在另一优选例中,所述无细胞冻干制剂中,所述淀粉相对于所述细胞提取物的重量百分比为2-15%,较佳地,5-12%,更佳地,7-10%。

[0021] 在另一优选例中,所述淀粉和淀粉酶的质量比为1.5×10^{7}:1-3×10^{8}:1,较佳地,2×10^{7}:1－2×10^{8}:1,更佳地,3×10^{7}:1－1.5×10^{8}:1。

[0022] 在另一优选例中,所述冻干制剂中,所述葡萄糖相对于所述无细胞冻干制剂的重量百分比为0.5%-5%,较佳地,0.7%-4%,更佳地,0.9%-3.6%。

[0023] 在另一优选例中,所述冻干制剂不包括保护剂(如冻干保护剂)。

[0024] 在另一优选例中,所述的无细胞冻干制剂由或基本上由组分(a)、(b)和(c)构成。

[0025] 在另一优选例中,所述的无细胞冻干制剂由或基本上由组分(a)、(b)、(c)和(d)构成。

[0026] 在另一优选例中,所述的组分(b)、(c)、(d)是额外添加的(即不是来自酵母提取物)。

[0027] 在另一优选例中,所述的无细胞冻干制剂进行重构后,形成无细胞的体外蛋白质合成体系(如酵母体外蛋白合成体系)。

[0028] 在另一优选例中,当所述的无细胞冻干制剂重构为液态制剂后,所述的组分(b)的浓度为100-450mM,较佳地,150-430mM,更佳地,200-400mM。

[0029] 在另一优选例中,当所述的无细胞冻干制剂重构为液态制剂后,所述组分(c)的浓度为0.0002-0.06mg/ml,较佳地,0.0008-0.04mg/ml,更佳地,0.002-0.02mg/ml。

[0030] 在另一优选例中,当所述的无细胞冻干制剂重构为液态制剂后,所述组分(d)的浓度为2-60mM,较佳地,5-50mM,更佳地,10-40mM。

[0031] 在另一优选例中,所述的重构为用水进行重构。

[0032] 在另一优选例中,所述的重构按0.5-1.5冻干制剂:7-12g水(较佳地,0.7-1.2g冻干制剂:8-11g水,更佳地,0.8-1g冻干制剂:9-9.5g水)进行重构。

[0033] 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。

[0034] 在另一优选例中，所述无细胞冻干制剂中，所述组分(a)的含量为10％－95％，较佳地，20％－80％，更佳地，40％－60％，以所述无细胞冻干制剂的总重量计。

[0035] 在另一优选例中，在重构后形成的体外蛋白质合成体系(如酵母体外蛋白合成体系)中，所述组分(a)的重量体积比为约50％。

[0036] 在另一优选例中，在重构后形成的体外蛋白质合成体系(如酵母体外蛋白合成体系)中，所述蛋白质体外合成的活性(RFU)≥1000，较佳地，1000-3000或1000-2500或1000-1500或1000-1200。

[0037] 在另一优选例中，所述无细胞冻干制剂还包括选自下组的一种或多种组分：

[0038] (c1)聚乙二醇；

[0039] (c2)用于合成RNA的底物；

[0040] (c3)用于合成蛋白的底物；

[0041] (c4)镁离子；

[0042] (c5)钾离子；

[0043] (c6)缓冲剂；

[0044] (c7)RNA聚合酶。

[0045] 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。

[0046] 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。

[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：磷酸三钾、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，所述聚乙二醇选自下组：PEG3000、PEG8000、PEG6000、PEG3350、或其组合。

[0051] 在另一优选例中，所述无细胞冻干制剂还包括(d1)外源的用于指导蛋白质合成的DNA分子。

[0052] 本发明第二方面提供了一种制备本发明第一方面所述的无细胞冻干制剂的方法，包括：

[0053] (i)提供一细胞提取物；

[0054] (ii)向所述的细胞提取物中添加淀粉；和淀粉酶，获得一混合物；和

[0055] (iii)将所述的混合物进行冻干，获得经冻干的本发明第一方面所述的无细胞冻干制剂。

[0056] 在另一优选例中，所述步骤(ii)中，所述混合物中还包括葡萄糖。

[0057] 在另一优选例中，所述混合物中还包括选自下组的一种或多种组分：

[0058] (c1)聚乙二醇；

[0059] (c2)用于合成RNA的底物；

[0060] (c3)用于合成蛋白的底物；

[0061] (c4)镁离子；

[0062] (c5)钾离子；

[0063] (c6)缓冲剂；

[0064] (c7)RNA聚合酶。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 在另一优选例中，所述细胞提取物包括酵母细胞提取物。

[0069] 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：

[0070] (i)提供酵母细胞；

[0071] (ii)对酵母细胞进行洗涤处理，获得经洗涤的酵母细胞；

[0072] (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

[0073] (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。

[0074] 在另一优选例中，所述的固液分离包括离心。

[0075] 在另一优选例中，在液态下进行离心。

[0076] 在另一优选例中，所述离心条件为5000-100000g，较佳地，8000-30000g。

[0077] 在另一优选例中，所述离心时间为0.5－2h，较佳地，20min－50min。

[0078] 在另一优选例中，所述离心在1-10℃下进行，较佳地，在2-6℃下进行。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 在另一优选例中，所述步骤(ii)中，所述冻干包括预冻阶段、冷冻干燥第一阶段、冷冻干燥第二阶段、和/或最终冻干阶段。

[0083] 在另一优选例中，所述步骤(ii)中，所述冻干步骤中，所述预冻阶段的冻结温度为-55±5℃，所述冷冻干燥第一阶段的冻结温度为-30±5℃，所述冷冻干燥的第二阶段的冻结温度为-25±5℃，所述最终冻干阶段的冻结温度为-20±5℃。

[0084] 在另一优选例中，所述步骤(ii)中，所述冻干步骤中，所述预冻阶段的干燥时间为4±4小时，所述冷冻干燥第一阶段的干燥时间为2-15小时，较佳地，3-12小时，所述冷冻干燥的第二阶段的干燥时间为10±2小时，所述最终冻干阶段的干燥时间为8-25小时，较佳地，10-20小时。

[0085] 在另一优选例中，所述的无细胞冻干制剂于密封状态下可在室温(20℃～25℃)储存一周以上，并且依然保持原有的蛋白质合成能力。

[0086] 在另一优选例中,所述步骤(ii)中,不需添加冻干保护剂。

[0087] 在另一优选例中,所述步骤(ii)中,所述混合物的体积5-15ml,较佳地,7-12ml,更佳的9-11ml。

[0088] 本发明第三方面提供了一种物质的用途,所述的物质包括淀粉和淀粉酶,并且所述物质用于制备提高蛋白合成活性的试剂。

[0089] 在另一优选例中,所述试剂还包括葡萄糖。

[0090] 本发明第四方面提供了一种试剂盒,所述的试剂盒包括容器以及位于所述容器中的本发明第一方面所述的无细胞冻干制剂。

[0091] 在另一优选例中,所述的试剂盒还包括使用说明书和任选的一种或多种选自下组的任选试剂:

[0092] (a)复苏液或复苏试剂;

[0093] (b)检测试剂。

[0094] 在另一优选例中,所述的复苏液或复苏试剂选自下组:水、Tris缓冲液、Hepes缓冲液、或其组合。

[0095] 在另一优选例中,所述复苏液或复苏试剂用于重构本发明第一方面所述的无细胞冻干制剂。

[0096] 在另一优选例中,所述的冻干制剂和任选试剂是独立包装的。

[0097] 本发明第五方面提供了一种表达待表达的外源蛋白的方法,包括:

[0098] (i)提供一体外蛋白质合成体系,其中所述的合成体系中含有淀粉;和淀粉酶;和

[0099] (ii)在适合表达蛋白的条件下,在所述外源蛋白的模板存在下,孵育所述体外蛋白质合成体系,从而表达所述的外源蛋白。

[0100] 在另一优选例中,所述体外蛋白质合成体系为本发明第一方面所述的无细胞冻干制剂经重构后形成的。

[0101] 在另一优选例中,所述体外蛋白质合成体系为未冻干的体外蛋白质合成体系。

[0102] 在另一优选例中,所述体外蛋白质合成体系包括酵母体外蛋白质合成体系。

[0103] 在另一优选例中,所述的淀粉;和淀粉酶为额外添加的。

[0104] 在另一优选例中,所述的合成体系中还含有葡萄糖。

[0105] 在另一优选例中,所述合成体系中还含有选自下组的一种或多种组分:

[0106] (c1)聚乙二醇;

[0107] (c2)用于合成RNA的底物;

[0108] (c3)用于合成蛋白的底物;

[0109] (c4)镁离子;

[0110] (c5)钾离子;

[0111] (c6)缓冲剂;

[0112] (c7)RNA聚合酶。

[0113] 在另一优选例中,所述的方法是非诊断性和非治疗性的。

[0114] 在另一优选例中,所述酵母体外蛋白合成体系为基因改造的克鲁维酵母体外蛋白合成体系(优选乳酸克鲁维酵母体外蛋白合成体系)。

[0115] 在另一优选例中,所述外源蛋白的编码序列来自原核生物、真核生物。

[0116] 在另一优选例中，所述外源蛋白的编码序列来自动物、植物、病原体。

[0117] 在另一优选例中，所述外源蛋白的编码序列来自哺乳动物，较佳地灵长动物，啮齿动物，包括人、小鼠、大鼠。

[0118] 在另一优选例中，所述的外源蛋白的编码序列选自下组：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、萤光素酶突变体的DNA、或其组合。

[0119] 在另一优选例中，所述外源蛋白选自下组：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、萤光素酶突变、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αA、白细胞介素-1β、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、或其组合。

[0120] 本发明第六方面提供了一种体外蛋白合成体系，包括：

[0121] (a)细胞提取物；和

[0122] (b)淀粉；和

[0123] (c)淀粉酶。

[0124] 在另一优选例中，所述体外蛋白合成体系还包括(d)葡萄糖。

[0125] 在另一优选例中，所述的体外蛋白合成体系为液态。

[0126] 在另一优选例中，所述的体外蛋白合成体系是用本发明第一方面所述的用于体外蛋白合成的无细胞冻干制剂经重构(或复溶)而形成的。

[0127] 在另一优选例中，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：

[0128] (c1)聚乙二醇；

[0129] (c2)用于合成RNA的底物；

[0130] (c3)用于合成蛋白的底物；

[0131] (c4)镁离子；

[0132] (c5)钾离子；

[0133] (c6)缓冲剂；

[0134] (c7)RNA聚合酶。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 在另一优选例中，所述体外蛋白合成体系为未冻干的体外蛋白合成体系。

[0139] 在另一优选例中，所述体外蛋白质合成体系为本发明第一方面所述的无细胞冻干制剂经重构(或复溶)后形成的。

[0140] 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

[0141] 图1是体外蛋白质合成无细胞冻干制剂制备流程示意图。冷冻干燥时将细胞提取物溶液与淀粉、淀粉酶等用于体外蛋白合成的其它试剂混合后存于-80℃冰箱预冻，然后将冷冻的混合好的体外蛋白合成体系放入冻干机，根据冻干样品的体积和容器种类调整冻干时间。冷冻干燥完成后取出样品，将容器密封以防止样品干粉受潮影响其活性。

[0142] 图2是冷冻干燥对1mL体外蛋白质合成体系活性的影响示意图。冻干组为无细胞冻干制剂复溶后形成的体外蛋白质合成体系合成的绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein,eGFP)的相对荧光单位值(Relative Fluorescence Units,RFU)，阳性对照为未经过冻干的体外蛋白质合成体系合成的绿色荧光蛋白的相对荧光单位值，阴性对照为未添加绿色荧光蛋白DNA的体外蛋白质合成体系。反应条件为20-25℃反应2h。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0143] 图3是冷冻干燥对10mL体外蛋白质合成体系的活性的影响示意图。冻干样品1,2,3为平行的无细胞冻干制剂复溶后形成的体外蛋白质合成体系合成的绿色荧光蛋白的相对荧光单位值，阳性对照为未经过冻干的体外蛋白质合成体系合成的绿色荧光蛋白的相对荧光单位值，阴性对照为未添加绿色荧光蛋白(eGFP)DNA的体外蛋白质合成体系。反应条件为20-25℃反应2h。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0144] 图4是冷冻干燥对不同体积不同容器的体外蛋白质合成体系的活性的影响示意图。体外蛋白质合成体系的体积分别为:10mL,7.5mL,5mL,2mL和1mL。每种体积分为三个平行样品，其中1mL体外蛋白质合成体系放于10mL西林瓶中冻干，其余4种不同体积的体外蛋白质合成体系放于15mL塑料离心管中冻干，阴性对照为未添加绿色荧光蛋白(eGFP)DNA的体外蛋白质合成体系。反应温度为20-25℃，反应时间为2h。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0145] 图5是对于细胞提取物冻干粉末与无细胞冻干制剂的体外蛋白合成能力的比较示意图。反应体系1,2,3为三个平行的无细胞冻干制剂复溶后形成的体外蛋白表达体系合成的绿色荧光蛋白的相对荧光单位值;细胞提取物1,2,3为将细胞提取物冻干粉复溶后，再加入用于体外蛋白质合成的其它试剂及外源DNA模板，合成的绿色荧光蛋白的相对荧光单位值，细胞提取物1,2,3为三个平行实验。反应温度为20-25℃，反应时间为2h。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0146] 图6是不同批次无细胞冻干制剂的体外蛋白合成能力影响示意图。反应温度为20-25℃，反应时间为2h。本实验检测了3个不同批次的细胞提取物的冻干粉的体外合成蛋白能力。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0147] 图7是无细胞冻干制剂储存于不同条件下6天后的活性变化示意图。本实验选取完全相同的细胞提取物蛋白合成体系(简写反应体系)存放于-80℃，-20℃，4℃和室温(20-25℃)，每种温度分为5个平行样品。在将样品存放于上述不同温度环境下6天后，检测所有细胞提取物蛋白合成体系的冻干粉的蛋白合成能力。反应温度为20-25℃，反应时间为2h。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0148] 图8是加入葡萄糖、淀粉或蔗糖的体外蛋白质合成体系的蛋白质合成能力比较示意图。对比例1为只加入葡萄糖的体外蛋白质合成体系，对比例2为加入葡萄糖和蔗糖的体外蛋白质合成体系，对比例3为加入淀粉但未加入淀粉酶的体外蛋白质合成体系，对比例4为只加入蔗糖的体外蛋白质合成体系，阳性对照为加入葡萄糖、淀粉和淀粉酶的体外蛋白质合成体系，阴性对照为未添加绿色荧光蛋白(eGFP)DNA的体外蛋白质合成体系。反应温度为20-25℃，反应时间为2h。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0149] 图9是体外蛋白质合成体系中淀粉的浓度优化示意图。淀粉在体外蛋白质合成体系中的终浓度由高到低为450mM，405mM，364mM，328mM，295mM，265mM，239mM，215mM。反应温度为20-25℃，反应时间为2h。所有误差为三次重复的标准偏差。

[0150] 图10是冷冻干燥对包含细胞提取物的体外蛋白合成体系的优化作用示意图。冷冻干燥后的体外蛋白合成体系只需加水和要表达的蛋白质的DNA模板即可合成蛋白，由于细胞提取物和用于体外蛋白合成的其它试剂需冷冻保存，所以使用其合成蛋白之前需将冰冻的细胞提取物和用于体外蛋白合成的其它试剂融化，耗费时间，而冻干之后的体外蛋白合成体系(也即无细胞冻干制剂)省去了融化的步骤，可以在良好的保存活性的前提下于室温或适当低温保存和运输，大大降低了保存和运输所需的设备要求和成本。

具体实施方式

[0151] 本发明人经过广泛而深入的研究，首次意外地发现，由特定比例的细胞提取物(如酵母细胞提取物)、淀粉、淀粉酶和任选的葡萄糖制成的无细胞冻干制剂可显著提高外源蛋白的合成活性，其RFU≥1000(如1000-1500)。并且本发明首次发现，淀粉、淀粉酶和任选的葡萄糖可以在未冻干的体外蛋白合成体系(如酵母体外蛋白合成体系)中促进体外蛋白的合成，并且可以在体外蛋白合成体系(如酵母体外蛋白合成体系)冻干之前、冻干的同时、冻干之后加入本发明的淀粉、淀粉酶和任选的葡萄糖，其中，在体外蛋白合成体系(如酵母体外蛋白合成体系)冻干之前加入淀粉、淀粉酶和任选的葡萄糖对蛋白合成的促进作用都很显著。在此基础上，完成了本发明。

[0152] 具体地，经过广泛研究和实验摸索，首次发现了一种可以用于具有合成能力的酵母细胞提取物的冻干方法，方便储存样品、降低成本，并且不需添加保护剂。与未冻干的酵母无细胞表达体系相比，不添加保护剂的经过冻干的酵母无细胞表达体系所合成的外源蛋白(如绿色荧光蛋白)活性的相对光单位值相当或更优，并且并未降低外源蛋白的活性，此外还节约了30-50min的融化时间，提高了稳定性，增加了反复使用的次数。

[0153] 细胞提取物

[0154] 在本发明中，所述细胞提取物为酵母细胞提取物。

[0155] 在一优选实施方式中，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。

[0156] 在本发明中，所述细胞提取物的含量没有特别限制。

[0157] 在一优选实施方式中，所述无细胞冻干制剂中，所述细胞提取物(如酵母细胞提取物)的含量为10％－95％，较佳地，20％－80％，更佳地，40％－60％，以所述无细胞冻干制剂的总重量计。

[0158] 冷冻干燥(或冻干工艺)

[0159] 为防止存储、运输和使用过程中的蛋白质变性,目前广泛应用的是冷冻干燥技术。冷冻干燥技术是将含水物质在低温下冻结,然后在真空条件下通过对冻干物料加热使冰升华,再除去物料中部分吸附水,得到干制品。有关蛋白质冷冻干燥的研究重点是保护剂的选择及浓度对冻干后蛋白质质量的影响。

[0160] 在本发明中,可以用常规的冷冻干燥技术(或冻干工艺)。

[0161] 在一优选实施方式中,所述冻干工艺包括预冻阶段、冷冻干燥第一阶段、冷冻干燥第二阶段、和/或最终冻干阶段。

[0162] 在一优选实施方式中,所述冻干工艺的冻结温度和干燥时间没有特别限制。

[0163] 在一优选实施方式中,所述冻干工艺中,所述预冻阶段的冻结温度为-55±5℃,所述冷冻干燥第一阶段的冻结温度为-30±5℃,所述冷冻干燥的第二阶段的冻结温度为-25±5℃,所述最终冻干阶段的冻结温度为-20±5℃。

[0164] 在一优选实施方式中,所述冻干工艺中,所述预冻阶段的干燥时间为4±4小时,所述冷冻干燥第一阶段的干燥时间为2-15小时,较佳地,3-12小时,所述冷冻干燥的第二阶段的干燥时间为10±2小时,所述最终冻干阶段的干燥时间为8-25小时,较佳地,10-20小时。

[0165] 在本发明中,体外蛋白质合成的无细胞冻干制剂制备过程不需要冻干保护剂的保护,也能完整的保存其体外蛋白合成的能力,并且还可显著提高体外蛋白合成的效率。无需冻干保护剂既简化了制备工艺,同时也减少了可影响细胞提取物活性的因素。

[0166] 无细胞冻干制剂及其制备

[0167] 本发明提供了一种用于体外蛋白合成的无细胞冻干制剂,所述冻干制剂包括:

[0168] (a)细胞提取物,所述的细胞提取物为酵母细胞的提取物;

[0169] (b)淀粉;和

[0170] (c)淀粉酶。

[0171] 在一优选实施方式中,本发明的冻干制剂还包括葡萄糖。

[0172] 在本发明中,所述冻干制剂不含有保护剂(如冻干保护剂)。

[0173] 在本发明中,本发明的无细胞冻干制剂用如下方法进行制备:

[0174] (i)提供一细胞提取物,所述的细胞提取物为酵母细胞的提取物;

[0175] (ii)向所述的细胞提取物中添加淀粉;和淀粉酶,获得一混合物;和

[0176] (iii)将所述的混合物进行冻干,获得经冻干的本发明所述的无细胞冻干制剂。

[0177] 在一优选实施方式中,步骤(ii)中,所述混合物还含有葡萄糖。

[0178] 在一优选实施方式中,步骤(ii)中,所述混合物还含有选自下组的一种或多种组分:

[0179] (c1)聚乙二醇;

[0180] (c2)用于合成RNA的底物;

[0181] (c3)用于合成蛋白的底物;

[0182] (c4)镁离子;

[0183] (c5)钾离子;

[0184] (c6)缓冲剂;

[0185] (c7)RNA聚合酶。

[0186] 在本发明中，所述淀粉；和淀粉酶、任选的葡萄糖可以在冻干之前、冻干的同时、冻干之后加入。

[0187] 在本发明中，所述淀粉；和淀粉酶、任选的葡萄糖的含量没有特别限制。

[0188] 在一优选实施方式中，所述无细胞冻干制剂中，所述淀粉相对于所述细胞提取物的重量百分比为2-15％，较佳地，5-12％，更佳地，7-10％。

[0189] 在另一优选例中，所述淀粉和淀粉酶的质量比为1.5×10^{7}:1-3×10^{8}:1，较佳地，2×10^{7}:1－2×10^{8}:1，更佳地，3×10^{7}:1－1.5×10^{8}:1。

[0190] 在另一优选例中，所述冻干制剂中，所述葡萄糖相对于所述无细胞冻干制剂的重量百分比为0.5％-5％，较佳地，0.7％-4％，更佳地，0.9％-3.6％。

[0191] 在另一优选例中，当所述的无细胞冻干制剂重构为液态制剂后，所述的淀粉的浓度为100-450mM，较佳地，150-430mM，更佳地，200-400mM。

[0192] 在另一优选例中，当所述的无细胞冻干制剂重构为液态制剂后，所述淀粉酶的浓度为0.0002-0.06mg/mL，较佳地，0.0008-0.04mg/mL，更佳地，0.002-0.02mg/mL。

[0193] 在另一优选例中，当所述的无细胞冻干制剂重构为液态制剂后，所述葡萄糖的浓度为2-60mM，较佳地，5-50mM，更佳地，10-40mM。

[0194] 实验证明，本发明的淀粉、淀粉酶和任选的葡萄糖具有显著提高蛋白合成活性的效果。

[0195] 酵母体外蛋白质合成体系

[0196] 如本文所用，术语“酵母体外蛋白合成体系”、“酵母无细胞表达体系”、“体外蛋白合成体系”、“体外表达系统”可互换使用。

[0197] 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。

[0198] 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[5]。

[0199] 在本发明中，酵母体外蛋白质合成体系不受特别限制，一种优选的酵母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)。

[0200] 在本发明中，所述酵母体外蛋白质合成体系包括：

[0201] (a)酵母细胞提取物；

[0202] (b)聚乙二醇；

[0203] (c)外源能量提供系统；和

[0204] (d)任选的溶剂，所述溶剂为水或水性溶剂。

[0205] 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，葡萄糖，淀粉，淀粉酶，磷酸三钾，二硫苏糖醇(DTT)，RNA聚合酶。

[0206] 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。

[0207] 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％，较佳地，30-60％，更佳地，40-50％。

[0208] 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。

[0209] 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。

[0210] 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：

[0211] (i)提供酵母细胞；

[0212] (ii)对酵母细胞进行洗涤处理，获得经洗涤的酵母细胞；

[0213] (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；

[0214] (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。

[0215] 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。

[0216] 在一优选实施方式中，所述离心在液态下进行。

[0217] 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5000-100000g，较佳地，8000-30000g。

[0218] 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。

[0219] 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。

[0220] 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。

[0221] 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。

[0222] 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。

[0223] 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、0.08mM。

[0224] 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)。

[0225] 在优选例中,所述体外蛋白质合成体系还含有葡萄糖。葡萄糖的浓度没有特别限制,通常葡萄糖的浓度为5-40mM,较佳地,10-30mM,更佳地,10-15mM。

[0226] 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:22mM,pH为7-8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,10-40mM葡萄糖,200-400mM淀粉,0.002-0.02mg/mL淀粉酶,1.7mM二硫苏糖醇,1%-4%聚乙二醇,8-20ng/μL绿色荧光蛋白的DNA,0.027-0.054mg/mL T7RNA聚合酶,20-25mM磷酸三钾。

[0227] 在本发明中,所述酵母体外蛋白合成体系可以为未冻干的,可以是将本发明的无细胞的冻干制剂重构(加复溶试剂,如水,比例为,0.5-1.5g冻干制剂:7-12g水,较佳地,0.7-1.2g冻干制剂:8-11g水,更佳地,0.8-1g冻干制剂:9-9.5g水)后形成的。

[0228] 在一优选实施方式中,在重构后形成的酵母体外蛋白合成体系中,所述细胞提取物(如酵母细胞提取物)的重量体积比为约50%。

[0229] 在本发明中,淀粉、淀粉酶和任选的葡萄糖可以添加入未冻干的酵母体外蛋白合成体系,也可以添加入冻干的酵母体外蛋白合成体系。

[0230] 本发明的主要优点包括:

[0231] (1)本发明的无细胞冻干制剂的制备方法可以用于所有含有细胞提取物的生物合成体系的冻干,尤其使得体外蛋白表达使用更简单快捷。

[0232] (2)本发明的冷冻干燥方法省略了耗时耗力的细胞提取物及体外蛋白合成体系中其它试剂的低温储存和运输,极大地提高了工作效率,节省大量时间和成本。

[0233] (3)与仅冻干细胞提取物的系统相比,本发明的无细胞冻干制剂使用更加方便,使用时只需加水复溶及加入DNA模板,经孵育后即可完成反应。

[0234] (4)本发明中制备的体外蛋白质合成体系避免了反复冻融,有效保存了蛋白合成能力。

[0235] (5)本发明中制备的体外蛋白质合成体系方便分批使用,增加了体系保存和使用的稳定性,增加了后续实验的可重复度。

[0236] (6)本发明中的制备无细胞冻干制剂的技术方案克服现有技术的缺陷,适于放大、工业化生产、运输、存储、分装、具有更大的优势和前景。

[0237] (7)本发明首次发现,不加保护剂(如冻干保护剂)的本发明的体外蛋白合成体系,冻干后可显著提高体外蛋白的合成效率。

[0238] (8)本发明首次发现,将细胞提取物(优选酵母细胞提取物)和淀粉、淀粉酶以及任选的葡萄糖以一定比例混合所制成的冻干制剂,可显著提高蛋白合成的活性。

[0239] (9)本发明首次发现,本发明的淀粉和淀粉酶以及任选的葡萄糖具有提供能量和提高蛋白合成的双重效果。

[0240] 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。

[0241] 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。

[0242] 通用方法

[0243] 在本发明中,在获得酵母提取物后,加入淀粉、淀粉酶和任选的葡萄糖,再进行冷冻干燥,获得冻干的酵母提取物。

[0244] 实施例1液氮破碎法制备酵母细胞提取物

[0245] 1.1一级种子培养:用-80℃冻存菌种接种于摇瓶培养基中,30℃,200rpm培养至对数生长期。

[0246] 1.2二级种子培养:取适量一级种子菌液接种到二级种子,30℃,200rpm培养至对数生长期。

[0247] 1.3批培养阶段:将二级种子菌液接种到发酵罐中,温度控制在30℃培养10-12h,进入补料培养阶段,当OD600值为50-55时,收集细胞培养物。

[0248] 1.4将培养好的细胞培养物放在冰水混合物中预冷,时间为10-30min。

[0249] 1.5将1.4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:3,000g、10min、4℃,得到酵母细胞。

[0250] 1.6用预冷的Washing buffer对1.5酵母细胞用washing buffer进行重悬,将得到的重悬液进行离心,离心条件:3000g、10min、4℃,得到酵母细胞。Washing buffer组成为:20-30mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾,100-150mM醋酸钾,1-4mM醋酸镁;

[0251] 1.7重复1.6步骤2-3次。

[0252] 1.8将1.7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℃保存。

[0253] 1.9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1.8中-80℃保存的酵母细胞,转速:45,000rpm,破碎3-10min;将破碎好的低温粉末分装到50mL离心管中,称重并储存于-80℃待用。

[0254] 1.10将1.9中得到的酵母细胞破碎粉在室温下降温至4℃,每克细胞破碎粉用0.2-1mL 4℃预冷的Lysis buffer进行溶解,得到酵母细胞粗提物。Lysis buffer由10-40mM pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸钾,50-150mM醋酸钾,1-4mM醋酸镁,2-7mM二硫苏糖醇,0.5-2mM苯甲基磺酰氟组成。

[0255] 1.11把步骤1.10中收获的酵母细胞粗提物进行离心1-2次,离心力为12000-30000g时间为30min,温度为4℃;

[0256] 1.12离心后,取上层澄清液体即为酵母细胞提取物溶液。

[0257] 1.13将制备好的酵母细胞提取物溶液分装,并在液氮中速冻后于-80℃保存。

[0258] 实施例2体外蛋白质合成体系

[0259] 2.1体外蛋白质合成体系:终浓度为22mM pH为7-8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(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),0.08-0.24mM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),

1.7mM二硫苏糖醇,10-40mM葡萄糖,200-400mM淀粉,0.002-0.02mg/mL淀粉酶,20-25mM磷酸三钾,0.027-0.054mg/mL T7RNA聚合酶,1%-4%的聚乙二醇,最后加入50%体积的酵母细胞提取物溶液。

[0260] 实施例3体外蛋白合成体系的冷冻干燥

[0261] 3.1将-80℃保存的酵母提取物放置于室温,解冻。

[0262] 3.2将解冻的酵母提取物与淀粉、淀粉酶及任选的葡萄糖、聚乙二醇、用于合成RNA的底物、用于合成蛋白的底物、镁离子、钾离子、缓冲剂、RNA聚合酶等试剂混合后分装于已称重的玻璃瓶或离心管内,每个玻璃瓶约1毫升细胞提取物,每个离心管约10毫升细胞提取物。

[0263] 3.3将玻璃瓶和离心管再次称量,并做好记录。

[0264] 3.4将3.3中的装有体外蛋白合成体系的玻璃瓶和离心管,预冻于-80℃,预冻时间为2-4h。

[0265] 3.5设置冷冻干燥程序:预冻阶段:-55℃,4h;冷冻干燥第一阶段:-30℃,4-10h;冷冻干燥第二阶段:-25℃,10h;最终冻干阶段:-20℃,10-20h。

[0266] 3.6将3.4中预冻好的细胞提取物玻璃瓶和离心管,放置于冻干机的平板上,进行冻干程序,真空度约为0.1Mpa,得到无细胞冻干制剂。

[0267] 3.7将无细胞冻干制剂密封储于低温或室温保存,或直接加入与冻干前的相等质量的水,形成的体外蛋白合成体系中各组分的浓度如实施例2.1所示,混匀进行后续的蛋白质体外合成活性测定。

[0268] 3.8体外蛋白质合成反应:在上述的反应体系中加入8-20ng/μL eGFP绿色荧光蛋白DNA,放置在20-30℃的环境中,震荡反应2-6h。

[0269] 3.9绿色荧光蛋白活性测定:反应结束后,在96孔黑板或384孔黑板中加入10μL反应体系溶液,立即放置于Tecan 2000多功能酶标仪,读数,检测绿色荧光蛋白活性,相对荧光单位值(Relative Fluorescence Units,RFU)作为活性单位。

[0270] 实验结果

[0271] 1.冷冻干燥对1mL体外蛋白质合成体系冻干的无细胞冻干制剂的活性的影响

[0272] 从图2可以看出,对于1mL的体外蛋白质合成体系冻干的无细胞冻干制剂重新加水溶解后,仍保持原有的体外蛋白合成能力,同时冻干过程中并不需要额外添加任何冻干保护剂。由此可见,无细胞冻干制剂仍具有较强的蛋白合成能力。

[0273] 2.冷冻干燥对10mL体外蛋白质合成体系冻干的无细胞冻干制剂的活性的影响

[0274] 从图3可以看出,对于10mL的体外蛋白质合成体系冻干的无细胞冻干制剂重新加水溶解后,仍保持原有的体外蛋白合成能力,同时冻干过程中并不需要添加任何冻干保护剂。由此可见,无细胞冻干制剂仍具有较强的蛋白合成能力。

[0275] 3.不同体积的体外蛋白质合成体系冻干的无细胞冻干制剂的体外蛋白合成能力比较

[0276] 从图4可以看出,对于不同体积(10mL、7.5mL、5mL,2mL和1mL)的体外蛋白质合成体系冻干的无细胞冻干制剂加水复溶后进行蛋白质合成,其活性都与阳性对照组的活性一致,均保留了原有的体外合成蛋白质的能力。

[0277] 4.对于细胞提取物冻干粉末与无细胞冻干制剂的体外蛋白合成能力的比较

[0278] 从图5中可以看出，细胞提取物冻干粉末的三个平行样品和无细胞冻干制剂的三个平行样品的活性均没有系统性差异。

[0279] 5.不同批次无细胞冻干制剂的体外蛋白合成能力

[0280] 从图6中可以看出，3组不同批次的无细胞冻干制剂活性均达到阳性对照的荧光单位强度，无细胞冻干制剂的活性稳定。

[0281] 6.无细胞冻干制剂储存于不同条件下6天后的活性变化

[0282] 从图7中可以看出，储存在-80℃、-20℃和4℃的无细胞冻干制剂良好的保存了其原有的体外蛋白合成的能力，其活性均达到阳性对照的水平。对于储存在室温(25℃)的无细胞冻干制剂，活性在6天后稍有降低，达到阳性对照的80％。

[0283] 7.加入葡萄糖、淀粉或蔗糖的体外蛋白质合成体系的蛋白质合成能力比较

[0284] 从图8中可以看出，只加入了葡萄糖的相对荧光单位值为114，只加入葡萄糖和淀粉的相对荧光单位值为205，只加入淀粉的相对荧光单位值为754，只加入蔗糖的相对荧光单位值为250。

[0285] 而加入了淀粉、淀粉酶和葡萄糖的阳性对照的相对荧光单位值1084，其体外蛋白质合成体系的蛋白合成能力显著提高。

[0286] 8.体外蛋白质合成体系中淀粉的浓度优化

[0287] 从图9中可以看出，在淀粉浓度为364mM时，其蛋白质合成能力最高。

[0288] 参考文献

[0289] 1.Allison SD,Randolph TW,Manning MC,Middleton K,Davis A,Carpenter JF.Effects of drying methods and additives on structure and function of actin:mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition.Archives of Biochemistry&Biophysics.1998;358(1):171-81.

[0290] 2.Carpenter JF,Arakawa T,Crowe JH.Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying.Developments in Biological Standardization.1992;74(12):225.

[0291] 3.Pisano R,Rasetto V,Barresi AA,Kuntz F,Aoude-Werner D,Rey L.Freeze-drying of enzymes in case of water-binding and non-water-binding substrates.European Journal of Pharmaceutics&Biopharmaceutics Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik E V.2013;85(3):974-83.

[0292] 4.Smith MT,Berkheimer SD,Werner CJ,Bundy BC.Lyophilized Escherichia coli-based cell-free systems for robust,high-density,long-term storage.Biotechniques.2014;56(4):186-93.

[0293] 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。

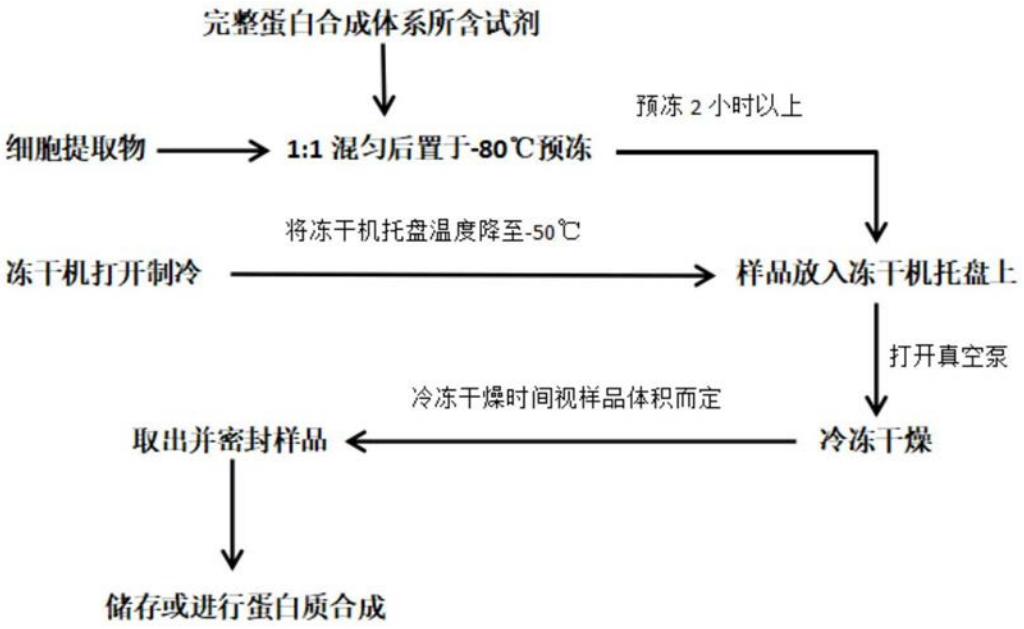

完整蛋白合成体系所含试剂
细胞提取物
1:1 混匀后置于-80℃预冻
预冻 2 小时以上
冻干机打开制冷
将冻干机托盘温度降至-50℃
样品放入冻干机托盘上
打开真空泵
冷冻干燥
冷冻干燥时间视样品体积而定
取出并密封样品
储存或进行蛋白质合成

图1

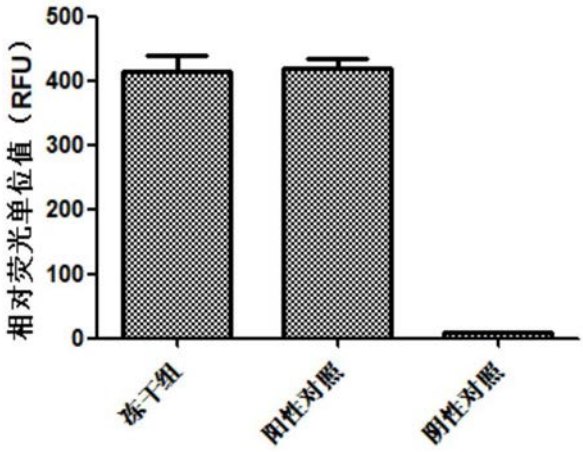

相对荧光单位值（RFU）
500
400
300
200
100
0
冻干组
阳性对照
阴性对照

图2

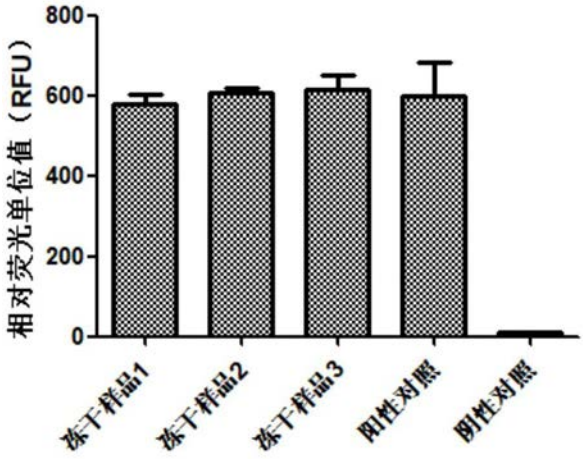

800
600
400
200
0
相对荧光单位值（RFU）
冻干样品1
冻干样品2
冻干样品3
阳性对照
阴性对照

图3

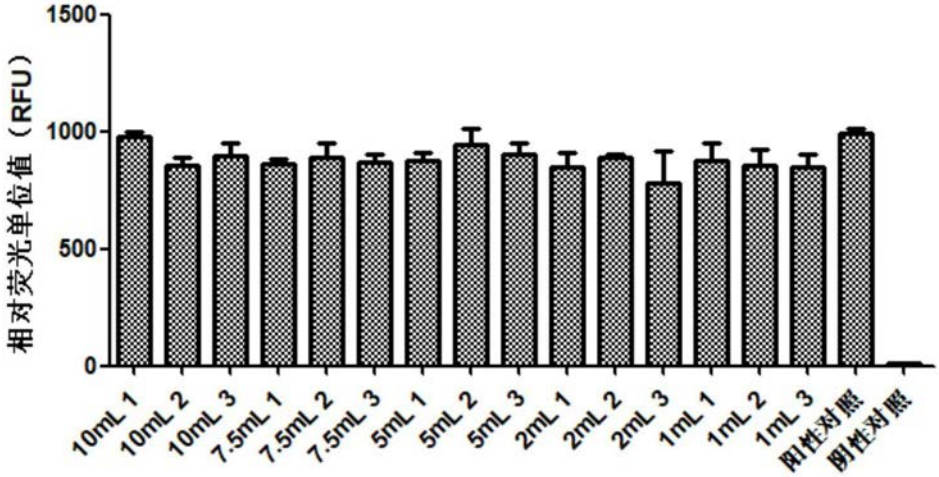

1500
1000
500
0
相对荧光单位值（RFU）
10mL 1
10mL 2
10mL 3
7.5mL 1
7.5mL 2
7.5mL 3
5mL 1
5mL 2
5mL 3
2mL 1
2mL 2
2mL 3
1mL 1
1mL 2
1mL 3
阳性对照
阴性对照

图4

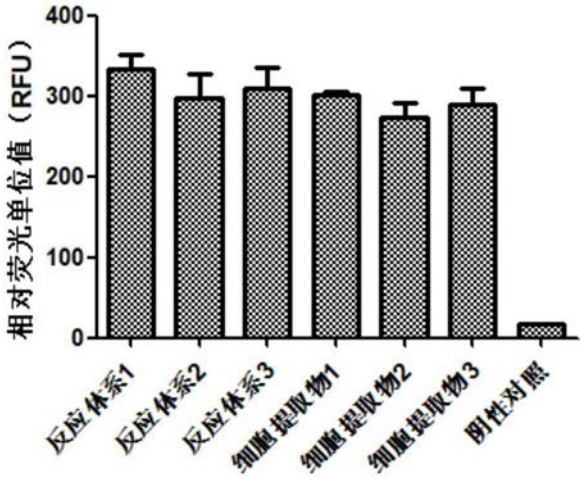

400
300
200
100
0
相对荧光单位值（RFU）
反应体系1
反应体系2
反应体系3
细胞提取物1
细胞提取物2
细胞提取物3
阴性对照

图5

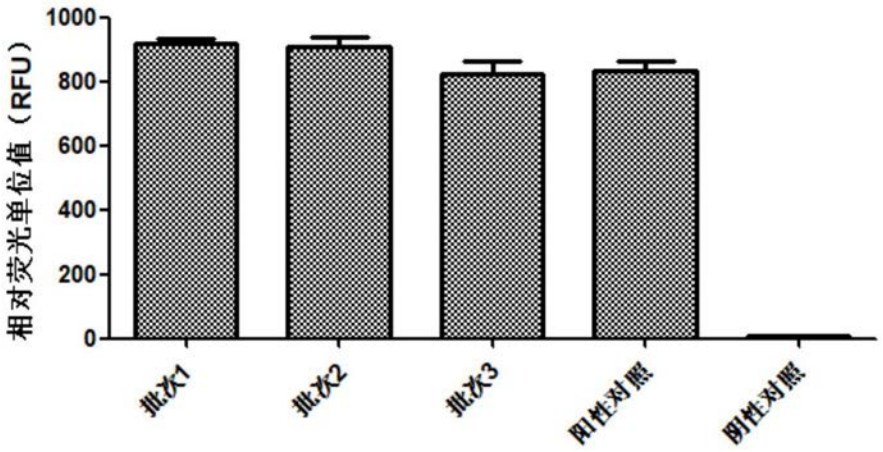

相对荧光单位值（RFU）
1000
800
600
400
200
0
批次1
批次2
批次3
阳性对照
阴性对照

图6

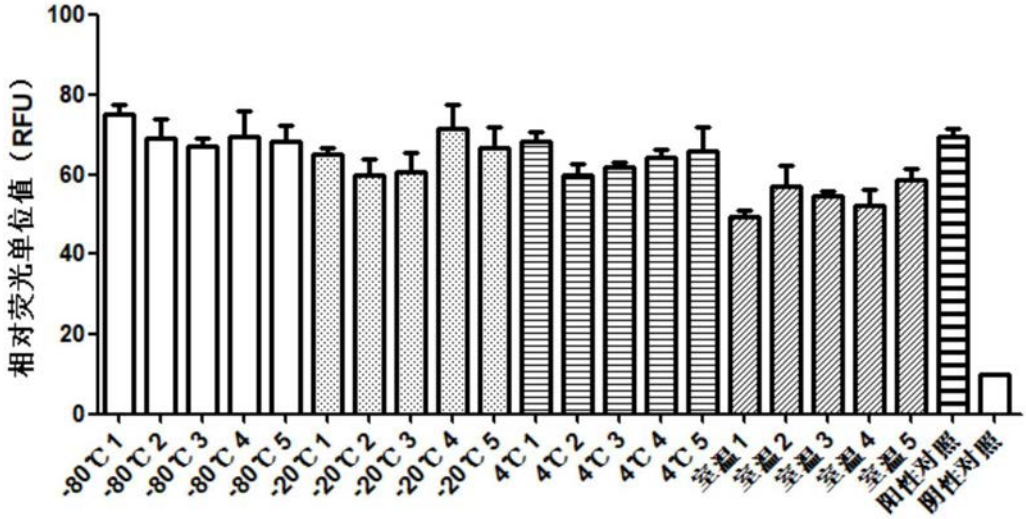

相对荧光单位值（RFU）
100
80
60
40
20
0
-80℃1
-80℃2
-80℃3
-80℃4
-80℃5
-20℃1
-20℃2
-20℃3
-20℃4
-20℃5
4℃1
4℃2
4℃3
4℃4
4℃5
室温1
室温2
室温3
室温4
室温5
阳性对照
阴性对照

图7

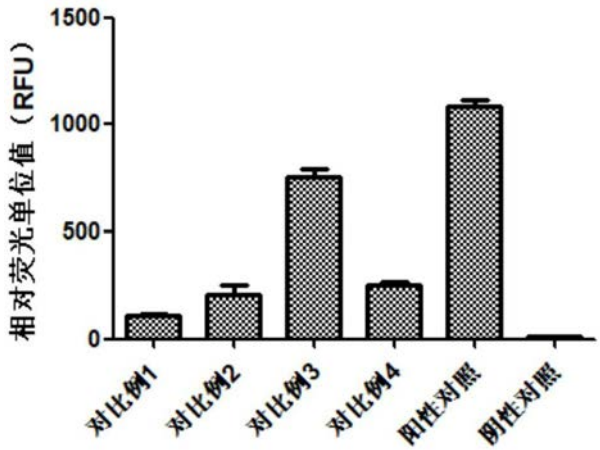

相对荧光单位值（RFU）
1500
1000
500
0
对比例1
对比例2
对比例3
对比例4
阳性对照
阴性对照

图8

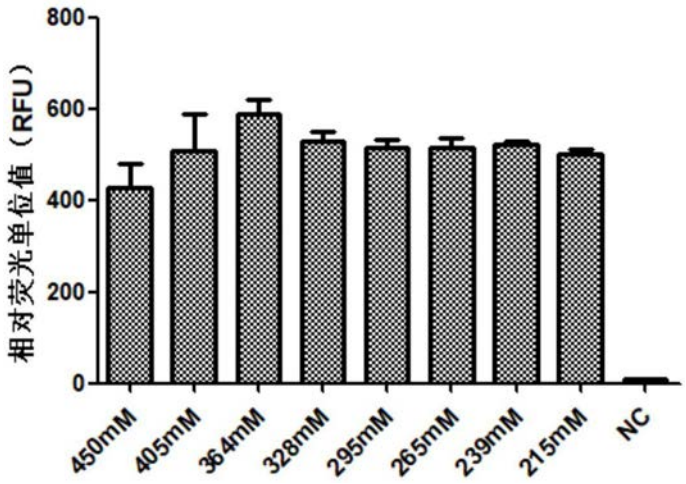

800
600
400
200
0
相对荧光单位值（RFU）
450mM
405mM
364mM
328mM
295mM
265mM
239mM
215mM
NC

图9

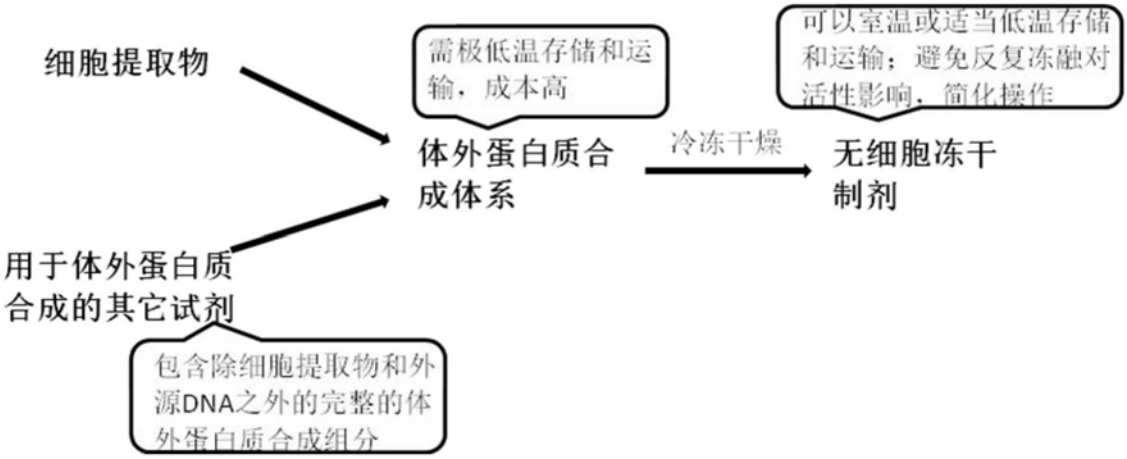

细胞提取物
需极低温存储和运输，成本高
可以室温或适当低温存储和运输；避免反复冻融对活性影响，简化操作
体外蛋白质合成体系
冷冻干燥
无细胞冻干制剂
用于体外蛋白质合成的其它试剂
包含除细胞提取物和外源DNA之外的完整的体外蛋白质合成组分

图10