

无细胞系统原位制备蛋白质芯片及其应用*

章杰^{1,2)} 刘琼明^{2)**} 许丹科^{2)**} 贺福初²⁾

¹⁾北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100022;

²⁾蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 102206)

摘要 主要介绍了目前在生物芯片表面进行蛋白质无细胞表达与定向制备蛋白质芯片的研究进展, 包括各种基因植入芯片的方法、蛋白质体外不同表达的途径、蛋白质固定的策略以及可能的应用发展前景等。蛋白质芯片以其高通量、高灵敏和检测迅速等优点正成为蛋白质组学研究中的重要工具之一。蛋白质的高效表达与纯化、蛋白质在芯片表面的有效固定与蛋白质活性的保持等内容是蛋白质芯片技术发展的关键。采用纳米生物技术与无细胞表达系统, 已经可以在生物芯片表面通过植入基因的方式制备相关的蛋白质芯片, 从而为蛋白质芯片的原位制备开辟了新的方向。

关键词 蛋白质芯片, 无细胞蛋白质表达, 体外蛋白质表达, 原位制备蛋白质阵列, 无细胞系统

学科分类号 Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00512

蛋白质是生命活动的主要载体和功能执行者。从基因的复制到相关蛋白质的表达蕴涵着生命活动最根本的物质基础的创造过程, 其过程的复杂性以及种类的多样性体现了生命科学研究的博大精深。近年来, 随着蛋白质分子机器、蛋白质芯片等与蛋白质相关的前沿领域的兴起以及纳米生物技术的迅速发展, 人们已经具备了在生物芯片表面合成、组装不同功能的蛋白质分子的生物纳米技术, 从而实现了从基因的植入到功能蛋白质表达的体外仿生过程。生物芯片高密度与高精度的特点为将来研制具有复杂生物功能的蛋白质芯片开辟了新的方向。

传统的蛋白质芯片是将种类众多的经纯化的蛋白质以高通量阵列的方式排布于芯片表面, 从而制备成蛋白质芯片, 然后将它与蛋白质、DNA 等目标分子反应, 实现蛋白质与蛋白质、蛋白质与 DNA 等生物分子相互作用的平行筛选分析的研究。虽然蛋白质芯片技术具有高通量、高灵敏、检测迅速等优点, 但蛋白质芯片的制备必须解决蛋白质的通量化表达与纯化、蛋白质在芯片表面的有效固定与活性保持等关键问题。如何实现蛋白质芯片的快速、高效制备一直是蛋白质芯片技术研究与发展的重要领域。与传统的蛋白质芯片制备方法相比, 研究在芯片表面开展蛋白质的定向原位合成, 不仅能避免制备蛋白质芯片时必须首先制备与纯化大量蛋白质的繁琐过程, 并可使芯片上的蛋白质更

好地固定并有效折叠, 而且有利于增加对表达过程的关键环节的了解, 达到控制蛋白质体外表达进程的体外仿生效能。目前芯片的蛋白质原位合成主要运用无细胞蛋白质表达系统, 而基因的植入与固定方法、蛋白质表达过程中相关元件的捕获与固定等整个蛋白质分子的体外合成与固定过程是研究的焦点。本文将主要介绍目前国际上在此研究方向上的进展。

1 无细胞表达系统

无细胞表达系统 (cell-free expression system) 是一种以外源 mRNA 或 DNA 为模板, 通过在细胞抽提物的酶系中补充底物和能源物质来合成蛋白质的体外系统。其最初源自 Zamecnik 等利用无细胞系统进行的多肽合成, 其研究表明了多肽合成发生在核糖体, 并需要 ATP、GTP 和 tRNA。其后, Nirenberg 等利用 *E. coli* 细胞提取物进行体外蛋白质合成用于遗传密码的解析。之后, Zubay 改进了该系统, 减少了由内源 DNA 或 RNA 造成的背景多肽的合成并提高了目的多肽的产量。随后, 其他

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB910803)。

** 通讯联系人。

刘琼明. Tel/Fax: 010-80727777-1228, E-mail: liuqiongming@nic.bmi.ac.cn

许丹科. Tel/Fax: 010-80705199, E-mail: xudk@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2008-07-17, 接受日期: 2008-10-20

无细胞表达系统也相继得以开发出来^[1~3].

无细胞表达系统的来源通常有两种途径：一种是通过重组纯化的翻译系统的所需组分来获得(如：PURE 系统)^[4,5]，这种策略虽可排除无关因子的干扰，但由于无细胞表达系统参与因子众多，逐个表达纯化非常繁琐，故仅限于实验研究。应用最为广泛的是基于天然细胞提取物的无细胞系统。未经加工的天然提取物在实际运用过程中常出现如下问题：能量易迅速耗竭；细胞自身的核酸会影响目的蛋白的合成；模板 DNA 或 mRNA 及合成后的蛋白质产物有可能被细胞裂解物中的蛋白酶与核酸酶降解。目前，常用的无细胞系统，都经过了特殊处理，已能部分克服上述缺陷。

理论上说，各种细胞都可以制备成供体外表达的细胞裂解物。在实际应用中，最常用的三类体外表达系统都源自于需要高效合成蛋白质的细胞——*E. coli* S30 提取物、兔网织红细胞裂解液(rabbit reticulocyte lysate)、麦芽胚提取物(wheat germ extract)，这些提取物包含高活性的翻译因子及低的蛋白质活性、核酸活性^[6]。与细胞表达系统相类似，原核来源的 *E. coli* S30 提取物的特点是：表达蛋白质快，基因构建简便、通用，但基因、蛋白质降解快，能量消耗快，系统生命期短，蛋白质产品易聚集，同时会产生大量的片段多肽。而真核来源的无细胞表达系统(如：麦芽胚、兔网织红细胞裂解液)具有更稳定、更长的生命期、能更好表达真核蛋白等特点，但其翻译慢、产量低，载体构建也较难。除上述三种无细胞系统外还有：极端嗜热菌(hyperthermophiles)，杂交瘤细胞(hybridomas)，爪蟾卵母细胞(*Xenopus oocytes*)，昆虫(insect)、哺乳动物(mammalian)甚至人类(human)细胞裂解液或提取物^[7~12]。

与细胞表达系统相比，无细胞表达系统的优点在于：表达蛋白质快速、准确；可合成不溶性、细胞毒性、低丰度及含非天然氨基酸等形式的蛋白质；可实现蛋白质表达的实时控制；突破了细胞的限制，利于实现自动化操作。鉴于这些优点，无细胞表达系统非常适合用于蛋白质芯片的研制^[7~9]。

2 无细胞表达系统在蛋白质芯片制备中的应用

尽管近年来蛋白质芯片研究获得了很大的发展和进步，但是，如何获得种类众多的用于芯片制备的蛋白质依然是蛋白质芯片应用中的主要瓶颈之

一。利用无细胞表达系统制备蛋白质芯片，能有效解决传统蛋白质芯片技术面临的诸如蛋白质的高效表达与纯化、蛋白质的固定、蛋白质稳定性的保持等难题，并发挥了芯片技术高通量、高灵敏、检测快捷等优点。目前，该方法已有一些初步研究报告，如此制备的蛋白质芯片可用于蛋白质相互作用的研究^[13]、蛋白质表达的筛选^[14]、抗体特异性筛选^[15,16]等功能研究。

利用无细胞系统制备蛋白质芯片，重点要解决 DNA/mRNA 模板的植入与固定、新生多肽的定向捕获等关键性技术问题。下面就目前开发的几种策略进行概述。

2.1 核酸编程性蛋白质阵列技术

核酸编程性蛋白质阵列技术(nucleic acid programmable protein array, NAPPA) (图 1a)是 Ramachandran 等^[13]研究开发出来的一种通过无细胞表达系统制备蛋白质芯片的方法，其原理是将亲和素(avidin)、抗 GST 多克隆抗体和生物素标记的质粒 DNA 混合，将其点于特定处理的玻片上。之后在玻片表面铺上一层含 T7 聚合酶的兔网织红细胞裂解液(rabbit reticulocyte lysate)，以直接在芯片

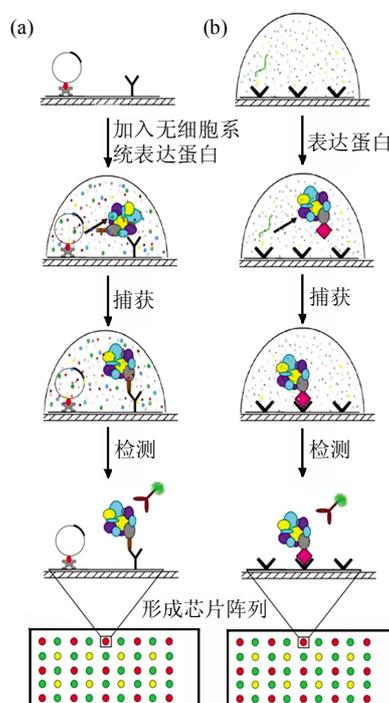


Fig. 1 Nucleic acid programmable protein array (a)^[13] and protein *in situ* array (b)^[15,16]

图 1 核酸编程性蛋白质阵列技术(a)^[13]与蛋白质原位阵列技术(b)^[15,16]

(a) NAPPA 技术. (b) PISA 技术. ☁: 无细胞系统; —: 芯片基底; ●: 生物素; X: 亲和素; Y: 抗 GST 抗体; ○: 质粒 DNA; ∇: Ni-NTA; —: 目的基因(线性); ◆: His × 6 标签; ●: 表达蛋白; —: 检测分子.

表面进行靶基因的体外转录 - 翻译偶联反应. 表达的目的蛋白通过 C 端融合的 GST 标签与芯片上的抗 GST 多克隆抗体结合而原位固定于玻片表面. 经 NAPPA 法制备的蛋白质芯片可用抗 GST 单克隆抗体或蛋白质特异性抗体进行检测.

运用此策略, 研究者研究了 29 个人 DNA 复制起始复合物蛋白质间的相互作用, 绘制出包含 110 对相互作用的图谱, 其中有 63 对为新发现的相互作用. 这表明通过无细胞体系制备蛋白质芯片可用于蛋白质功能研究, 且芯片直接以两蛋白质相互接触来确定两蛋白质间是否有相互作用, 避免了免疫共沉淀等技术不能排除的两个蛋白质通过桥梁蛋白而相互作用的假阳性情况. 每个点蛋白质表达量在 270 pg(4 fmols)到 2600 pg (29 fmols)之间. 据估计, 捕获的蛋白质约 10 fmol(675 pg)/点, 是传统蛋白质芯片的 1 000 倍, 表明通过无细胞表达系统获得的蛋白量足以满足蛋白质芯片的要求. 该法首次实现了由 DNA 阵列直接合成蛋白质阵列, 免除了传统蛋白质芯片制备过程中蛋白质表达纯化的繁杂过程和蛋白质存储中面临的蛋白质稳定性问题.

该策略的不足之处在于: 将目的基因克隆到 GST 标签载体上需要花费较长的时间; 对目的基因的固定需要对环形质粒 DNA 模板进行生物素标记, 需要探索合适的化学剂量, 否则量少会造成生物素与目的基因的解离, 量多会造成生物素与编码区的结合; 由于不同的模板在同一转录 - 翻译体系中平行表达, 同时通过相同的标签进行固定, 容易造成蛋白质点间的交叉污染; 且运用该法制备的蛋白质芯片除含有目的蛋白外, 还含有目的基因, 可能会影响进一步的功能研究.

2.2 蛋白质原位阵列技术

He 与 Taussig^[15, 16]最早提出了蛋白质原位阵列技术(*protein in situ array, PISA*)(图 1b), 他们将无细胞转录 - 翻译系统与 PCR 产物(含 His \times 6 或串联 His \times 6)混合共点于 Ni 螯合包被的芯片基底上. 通过无细胞转录 - 翻译系统对 PCR 产物进行表达, 表达的 His 标签蛋白通过与芯片表面的 Ni 特异性结合而得以固定, 经洗涤后可制备纯化的蛋白质阵列. 他们运用此技术制备了人单链抗体片段(VH/K 形式)和酶(荧光素酶)的蛋白质阵列, 并成功制备了包含单链抗体片段、配体结合蛋白、结构域和酶的蛋白质芯片, 并进行了蛋白质功能的研究.

多重点样技术(*multiple spotting technique, MIST*)^[17](图 2)是一种芯片点样技术, 即在同一微阵列位置上进行多次精确、重复的点样. Angenendt 等^[14]将 PISA 技术与 MIST 技术相结合进行蛋白质芯片研发. 首先将模板 DNA 非接触点样于氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)与 Ni 处理过的玻片表面, 随后, 通过二次原位点样方式点上 *E. coli* S30 抽提物系统, 进行 His \times 6 标签蛋白的表达. 通过对 GFP 蛋白的体外表达及检测, 显示表达的蛋白质可通过 His 标签与 Ni 的结合而固定到芯片上, 从而获得蛋白质芯片. 以 384 种来自人胎脑 cDNA 文库的 PCR 产物为模板, 通过无细胞原位表达蛋白制备了每片含 13 000 个点的高密度蛋白质阵列. 研究结果表明: PISA 与 MIST 相结合的策略在制备蛋白质芯片方面具有很好的效果, 制备出的蛋白质芯片具有更高的灵敏度和样点密度. 但 MIST 技术要求前后两次点样要有较好的重合性, 并避免与其他点的交联.

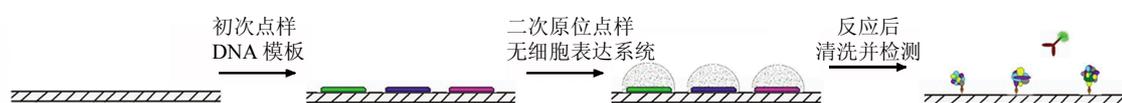


Fig. 2 Multiple spotting technique(MIST)^[17]

图 2 多重点样技术^[17]

///: 芯片基底; ●: 无细胞表达系统; Y: 检测分子; —: 目的基因 A; —: 目的基因 B; —: 目的基因 C; ●: 蛋白 a; ●: 蛋白 b; ●: 蛋白 c.

这两种方法的特点是目的基因并不固定于芯片基底表面, 最终形成的蛋白质芯片不含目的基因. 免去了对目的基因进行标记及在芯片基底上固定相应的标记捕获因子等操作. 但这些策略通过点样的形式加入无细胞系统, 限制了负责转录 - 翻译的细胞裂解液的用量, 可能会导致表达的痕量蛋白难以

进行检测及用于进一步的功能研究. 另外, Ni 离子通常对非靶标蛋白有较强的非特异性吸附, 从而造成蛋白质芯片的强背景, 甚至影响其应用.

2.3 mRNA 阵列来源原位嘌呤霉素捕获技术

mRNA 阵列来源原位嘌呤霉素捕获技术(*in situ puromycin capture from mRNA array, ISPCFmA*)^[9]是

利用 mRNA 展示技术原理以原位表达制备蛋白质芯片的技术. mRNA 展示技术是一种新兴的体外筛选蛋白质、多肽的技术手段, 其原理如下: 在体外翻译过程中, 核糖体沿着 mRNA 分子从 5' 端向 3' 端合成多肽或蛋白质, 当核糖体移动到 mRNA 末端时便停下来, 嘌呤霉素进入核糖体 A 位点, 由核糖体将合成的多肽或蛋白质与嘌呤霉素发生共价连接, 从而使多肽或蛋白质连接于被固定在链亲和素包被的芯片基底的生物素 - 嘌呤霉素链(5' 端连有生物素, 3' 端连有嘌呤霉素)上^[18].

ISPCFmA 技术有三种策略(图 3), 可用于制备蛋白质阵列.

策略一^[19](图 3a): 利用合成技术分别合成 3' 端标记生物素的 mRNA 分子、与 mRNA 3' 端互补的 RNA 寡核苷酸及生物素 - 嘌呤霉素寡核苷酸(BPoligos). 首先将 mRNA 分子和 RNA 寡核苷酸混合, 通过退火形成 mRNA 杂合链, 之后与 BPoligos 混合, 最后点到链亲和素包被的玻璃片上. 模板 mRNA 和 BP oligos 通过生物素与链亲和素的高亲和结合而固定到芯片表面. 之后加入兔网织红

细胞裂解液, 其中的核糖体在相关辅助因子协助下识别并结合 mRNA 5' 端的核糖体结合位点, 并开始表达多肽. 当核糖体移动到双链 RNA 处会停下来而不立即解离, 因此可提供足够的时间让嘌呤霉素进入核糖体的 A 位点, 从而将新生多肽固定到 BP oligos 上. 可采用 RNA 酶降解 mRNA 模板, 通过洗涤获得多肽芯片.

策略二^[19](图 3b): 运用 PCR 反应将启动子和 Hisx6(用于检测)DNA 序列分别加到每个 DNA 模板的 5' 和 3' 端(非 3' 末端), 通过体外转录获得 mRNA 模板, 同时合成一条与 mRNA 分子 3' 末端配对的 BP oligos, 通过退火得到 mRNA-DNA 杂合链. 将该杂合链点于链亲和素包被的芯片基底上而固定, 之后加入无细胞表达系统进行蛋白质翻译, 当核糖体移动到 RNA-DNA 杂合链处会停下来, 此时嘌呤霉素进入核糖体的 A 位点, 新合成的蛋白质与 BP oligos 的嘌呤霉素共价结合得以固定到芯片上. 再在相关因子的协助下折叠为具有功能活性的蛋白质, 而后用 RNA 酶降解 RNA, 得到蛋白质芯片.

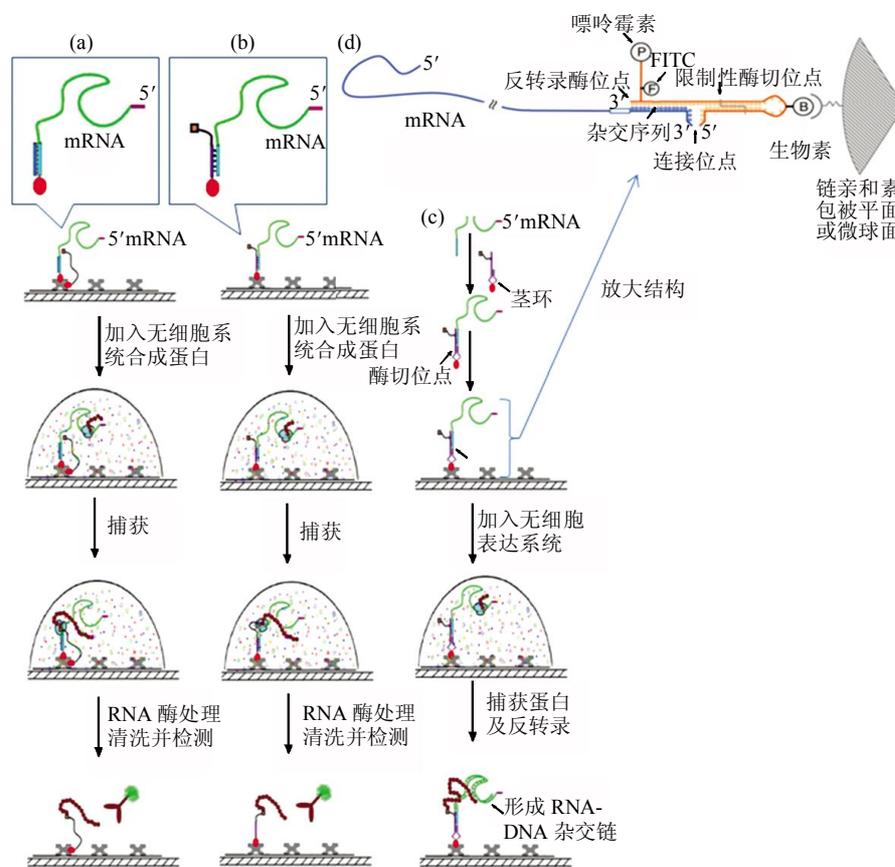


Fig. 3 *In situ* puromycin capture from mRNA array^[19, 20]

图 3 mRNA 阵列来源原位嘌呤霉素捕获技术^[19, 20]

(a) 策略一. (b) 策略二. (c) 策略三. (d) 嘌呤霉素-连接 DNA 结构. 无细胞表达系统; 芯片基底; ●: 生物素; -: 核糖体结合位点; -: DNA 寡核苷酸; -: RNA 寡核苷酸; X: 链亲和素; ~: mRNA; ●: 核糖体; ■: 嘌呤霉素; ---: 多肽; T: 检测分子.

策略三^[20](图 3c): 首先制备一个 5'端含连接酶位点, 3'端含一个反转录酶位点并且具有一嘌呤霉素的分叉的发卡结构——嘌呤霉素-DNA, 其茎环处标有生物素, 在发卡结构的双链上有一限制性内切酶酶切位点, 在合成蛋白质后可通过该酶切位点释放蛋白质. mRNA 与嘌呤霉素-DNA 3'端突出的一段序列杂交并通过连接酶与嘌呤霉素-DNA 5'端连接而形成嘌呤霉素-DNA/RNA 复合物. 该复合物通过生物素与链亲和素包被的芯片基底结合而固定, 再由无细胞表达系统表达蛋白质, 翻译至 mRNA 末端时由核糖体将新生多肽(或蛋白质)与嘌呤霉素结合成键, 从而固定蛋白质.

运用前两种策略, Tao 等改进了蛋白质的表达与固定, 一段双链 RNA 或 RNA-DNA 杂交链在翻译蛋白质及其固定中发挥了重要作用; 通过前两种策略, Tao 等制备了较高密度的多肽、蛋白质微阵列, 并利用两个酵母转录因子 Cbf1、Mcm1 与已知 DNA 序列的结合, 探讨了运用此策略在芯片上研究蛋白质功能的可行性. 研究还表明, 策略二可固定 27~57 ku 范围内的不同家族的全长蛋白. Shimizu 等虽未直接用策略三制备蛋白质芯片, 但他们采用此技术进行了固相翻译研究, 并使蛋白质可以在表达并固定后更有效地发挥活性.

ISPCFmA 技术表达的蛋白质在翻译最后由核糖体将其与嘌呤霉素相连而得以固定到芯片上, 与通过融合在蛋白质上的标签来固定的方法相比, 具有更高的定位效果, 同时可在同一封闭环境中表达多种蛋白质样品. 另外, 由于可采用 RNA 酶降解/限制性内切酶酶切固定在芯片上的 RNA 模板, 因此制备的蛋白质芯片也是纯蛋白质芯片. 但是该方法需要额外的操作来转录及修饰 mRNA, 无疑增加了实验步骤, 同时 RNA 容易降解, 不如 DNA 模板好操作.

2.4 “复印”法将 DNA 阵列转化为蛋白质阵列

He 等^[21]提出了制备蛋白质芯片的 DAPA(DNA array to protein array)法(图 4), 该法在芯片 a 上固定编码 C 端融合双 His₆ 标签蛋白的 DNA PCR 扩增产物以形成 DNA 阵列, 并与固定有 Ni-NTA 的芯片 b 面对面放置. 一张已加入无细胞转录-翻译偶联的细胞裂解液的渗透性膜被放于两芯片基底之间. 芯片 a 上固定的 DNA 信息经无细胞系统表达出带双 His₆ 标签的融合蛋白, 这些蛋白质通过渗透性膜, 迅速固定于芯片 b 的对应位置上. 最终形成对应于 DNA 阵列(芯片 a)的蛋白质芯片(芯片 b).

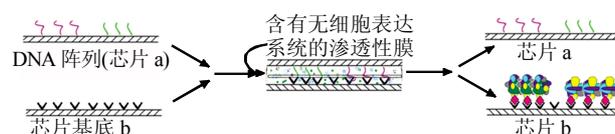


Fig. 4 DAPA method^[21]

图 4 DAPA 技术^[21]

—: 渗透性膜; ●: 蛋白 X; ●: 蛋白 Y; ○: 无细胞表达系统;
 5': 目的基因 X; 3': 目的基因 Y; ▽: 芯片基底; ▼: Ni-NTA;
 ◆: 串联 His₆ 标签.

他们通过该法用一张 DNA 芯片“复印”了 20 张蛋白质芯片, 并通过抗 GFP 抗体检测. 结果表明, 此方法可以很好地制备与 DNA 阵列相对应的蛋白质芯片, 并可反复“复印”多张蛋白质芯片, 在一定程度上达到了批量化生产的目的. 同时, 对应于直径为 250 μm 的 DNA 点产生的蛋白质点直径大小不一, 但服从分布曲线半高约为 275 μm 的高斯分布(gaussian profile). 他们的研究结果显示, 0.1 ng DNA 模板可产生 30 fmol 蛋白/点^[21], 而在 Angenendt 等^[22]的实验中约为 0.8 fmol/点, 表明 DAPA 法固定在芯片上的蛋白质量高. DAPA 方法在另一玻片表面制备蛋白质阵列, 其蛋白质阵列具有很高的纯度.

但该法固定高分子质量蛋白时, 其固定量会随之降低. 针对此问题, 可通过增加 DNA 模板量或更换更为有效的蛋白质标签加以调整. 其另一问题是, 检测结果显示, 固定的各蛋白质点形态不一, 个别蛋白质芯片的某些点发生了交联. 这需要对该技术做进一步改进.

3 结 论

与传统的蛋白质芯片制备技术相比, 基于芯片表面的蛋白质无细胞体外表达技术具有如下的显著特点:

a. 简化了蛋白质芯片制备的过程. 该技术直接将 DNA/mRNA 点于芯片基底, 利用无细胞体系在芯片基底原位表达蛋白. 通过抗 His 抗体-His 标签、生物素-亲和素等的亲和作用或嘌呤霉素与多肽链的共价结合而使蛋白质得以固定, 再通过漂洗除去未结合组分而使蛋白质得以纯化, 省去了预先表达、纯化蛋白质的繁琐操作.

b. 避免了传统蛋白质芯片在存储中的稳定性问题. 由于基因芯片相对于蛋白质芯片具有更高的稳定性, 在平时可以以基因芯片的形式储藏, 在使

用芯片前由基因芯片来表达制备蛋白质芯片, 因此蛋白质的活性得到了很好的保持.

c. 便于进行蛋白质 - 蛋白质相互作用研究. 可直接将潜在相互作用蛋白对的编码基因置于同一转录 - 翻译体系中进行表达, 之后通过适当的手段进行相互作用的检测, 可用于确定两蛋白质间是否发生直接的物理性相互作用.

总之, 基于芯片表面的蛋白质体外表达技术不仅使得蛋白质芯片的制备更迅速和方便, 而且为蛋白质的体外仿生表达提供了更多途径. 通过各种定向固定方法的研究, 为将来研制多功能的蛋白质芯片提供了诱人的发展方向和美好的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Zubay G. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. Annual Review of Genetic, 1973, **7**: 267~287
- 2 Nirenberg M W, Matthaei J H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthesis polynucleotides. Proc Natl Acad Sci USA, 1961, **47**(10): 1588~1602
- 3 Nakano H, Yamane T. Cell-free protein synthesis systems. Biotech Advan, 1998, **16**(2): 367~384
- 4 Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, *et al.* Cell-free translation reconstituted with purified components. Nat Biotechnol, 2001, **19**(8):751~755
- 5 Yan X H, Xu Z R. Ribosome-display technology:applications for directed evolution of functional proteins. Drug Discovery Today, 2006, **11**(19/20): 911~916
- 6 Spirin A S. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. Trend Biotech, 2004, **22**(10): 538~545
- 7 Endoh T, Kanai T, Sato Y T, *et al.* Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile. J Biotechnol, 2006, **126**(2): 186~195
- 8 Mikami S, Kobayashi T, Yokoyama S, *et al.* A hybridoma-based *in vitro* translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. J Biotechnol, 2006, **127**(1): 65~78
- 9 He M Y, Stoevesandt O, Taussig M J. *In situ* synthesis of protein arrays. Curr Opin Biotechnol, 2008, **19**(1): 4~9
- 10 Keller C, Hyrien O, Knippers R, *et al.* Site-specific and temporally controlled initiation of DNA replication in a human cell-free system. Nucleic Acids Res, 2002, **30**(10): 2114~2123
- 11 Landsverk H B, Hakelien A M, Kuntziger T, *et al.* Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract. EMBO Rep, 2002, **3**(4): 384~389
- 12 He M Y, Wang M W. Arraying proteins by cell-free synthesis. Biomol Eng, 2007, **24**(4): 375~380
- 13 Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, *et al.* Self-assembling protein microarrays. Science, 2004, **305**(5680): 86~90
- 14 Angenendt P, Kreutzberger J, Glokler J, *et al.* Generation of high density protein microarrays by cell-free *in situ* expression of unpurified PCR products. Mol Cell Proteomics, 2006, **5**(9): 1658~1666
- 15 He M Y, Taussig M J. Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and *in situ* immobilisation (PISA method). Nucleic Acids Res, 2001, **29**(15): 73~73
- 16 He M Y, Taussig M J. DiscernArray™ technology: a cell-free method for the generation of protein arrays from PCR DNA. J Immunol Methods, 2003, **274**(1~2): 265~270
- 17 Angenendt P, Glokler J, Konthur Z, *et al.* 3D protein microarrays: performing multiplex immunoassays on a single chip. Anal Chem, 2003, **75**(17): 4368~4372
- 18 张万巧, 王 建, 贺福初. mRNA 展示技术. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(8): 795~799
- 19 Zhang W Q, Wang J, He F C. Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(8): 795~799
- 19 Tao S C, Zhu H. Protein chip fabrication by capture of nascent polypeptides. Nat Biotechnol, 2006, **24**(10): 1253~1254
- 20 Biyani M, Husimi Y, Nemoto N. Solid-phase translation and RNA-protein fusion:a novel approach for folding quality control and direct immobilisation of proteins using anchored mRNA. Nucleic Acids Res, 2006, **34**(20): e140
- 21 He M, Stoevesandt O, Palmer E A, *et al.* Printing protein arrays from DNA arrays. Nat Method, 2008, **5**(2): 175~177

In situ* Fabrication and Application of Protein Microarray With Cell-free System

ZHANG Jie^{1,2}, LIU Qiong-Ming², XU Dan-Ke², HE Fu-Chu²**

¹ School of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China;

² Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Protein is one of major bio-functional performers. As one of several crucial proteomic research approaches, protein microarray has these following advantages: high-throughput, high sensitivity, quick detection and so on. Meanwhile, there are some critical factors that are important to the further development of protein microarray technology, for example, how to express and purify proteins for the research of protein microarray, how to immobilize proteins onto the substrate and keep the bio-function of proteins immobilized. Nano-biotechnology and cell-free expression system have been used to fabricate protein microarray by the way of immobilizing target genes onto the substrate and directly expressing corresponding proteins, which provides a new strategy to fabricate more complicated microarray. The strategy and its progress were summarized——fabrication of protein microarray based on DNA, including immobilization of target genes, cell-free expression to proteins, immobilization of renascence proteins, advantages and drawbacks of the methods of protein chip fabrication etc.

Key words protein microarray, protein expression with cell-free system, *in vitro* protein expression, *in situ* fabrication of protein arrays, cell-free system

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00512

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2006CB910803).

**Corresponding author.

LIU Qiong-Ming. Tel/Fax: 86-10-80727777-1228, E-mail: liuqiongming@nic.bmi.ac.cn

XU Dan-Ke. Tel/Fax: 86-10-80705199, E-mail: xudk@nic.bmi.ac.cn

Received: July 17, 2008 Accepted: October 20, 2008