

无细胞系统的基因表达与蛋白质合成*

王景林 高培基¹⁾

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 无细胞翻译——利用细胞提取液在体外合成蛋白质, 已是国外分子生物学实验室的一项常规技术, 但在国内此项技术的利用却几乎是空白. 对体外无细胞系统的特性、功能、优缺点及其进展等进行了全面的介绍, 以期使国内学者了解和利用这一方便而有效的表达系统, 进行应用生物化学与分子生物学的实验研究.

关键词 无细胞系统, 基因表达, 蛋白质合成

学科分类号 Q51

利用重组 DNA 技术在宿主细胞内表达外源的或合成的基因常常受到许多因素的限制. 主要有: a. 基因表达产物的不溶性和不稳定性; b. 细胞内蛋白酶对产物的降解; c. 某些产物对宿主细胞有毒性; d. 在原核细胞表达系统, 产物易形成不溶性的包涵体, 需要变性和重新折叠; e. 宿主细胞本身的基因调控机制在一定程度上要影响外源基因的有效表达等. 而无细胞系统易于解决上述问题, 因而在研究外源基因表达与蛋白质合成方面比传统的体内细胞表达系统具有更大的优越性.

最初建立的标准无细胞系统, 因采用分批方法, 具有反应时间短 (1 h 左右) 和产物得率低 (< 2 g/ml) 两个致命的缺点, 严重阻碍了它的应用. 1988 年, 前苏联学者 Spirin 等^[1]建立了一种可使外源基因高效表达的连续流动无细胞系统 (continuous flow cell free system, CFCF 系统). 即含有氨基酸、ATP 和 GTP 等物质的供给液通过蠕动泵连续恒速流入反应系统, 同时产物也以相同的速度经超滤膜滤出, 使其始终处于动态的平衡状态. 由于 CFCF 系统与标准的无细胞系统相比, 反应时间延长, 产物得率大幅度提高, 因此, 很快引起人们的重视, 并推动了体外无细胞系统的发展与应用.

1 无细胞系统及其功能

无细胞系统是指通过破碎细胞和离心方法得到的细胞裂解液或提取液. 最著名的无细胞系统是 Zubay^[2]于 1973 年建立的 *E. coli* S30 提取液, 以后又相继建立了兔网织红细胞裂解液、麦胚乳细胞和酵母菌细胞提取液等无细胞系统. 到目前为止, 来自原核和真核生物的无细胞系统已达十几种. 其中, 兔网织红细胞裂解液和麦胚乳提取液, 因具有来源方便、制备简单、核糖体与 mRNA 的高效结合及翻译忠实等优点, 成为最常用的无细胞系统, 而酵母菌细胞提取液因具有翻译后加工功能如糖基化修饰, 近年来也成为备受重视的无细胞系统.

无论是同源还是异源的 mRNA, 无细胞系统都能忠实而有效地翻译成相应的多肽和蛋白质, 所以, 外源基因表达及其功能蛋白质的合成无疑成为这一表达系统的首要应用领域. 如二氢叶酸还原酶、醛缩酶、珠蛋白、IL-2 和 IFN- α 等多种基因在 CFCF 系统中, 几乎都能得到制备水平的基因表达^[1, 3~5].

其次, 它是研究蛋白质合成机制的一个有

* 国家自然科学基金资助项目 (3967005).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-06-10, 修回日期: 1998-03-18

力工具. 可分析与研究蛋白质结构与功能之间的关系, 膜蛋白的生物合成, 蛋白质分子折叠及其跨膜运送的机制.

第三, 它为基因表达的调控研究提供了方便条件. 通过体外无细胞系统, 真核基因表达的调控如翻译起始、转录产物的加工与修饰、mRNA 前体的加工与剪接等机制已得到一定的阐明. 还可分析与研究未知蛋白质的基因结构如它的开放阅读框架. 因此, 人们把体外无细胞系统比喻为“遗传信息解释者”.

第四, 可进行蛋白质工程方面的研究. 因为无细胞系统不仅可以利用天然的氨基酸, 也能利用经修饰的或者非天然的氨基酸合成多肽和蛋白质. 这样可通过改变供给液的成分, 观察不同因素对所合成的多肽和蛋白质在构型和生物活性上的变化, 以及它们的前体是如何进行翻译后修饰的, 进而指导蛋白质的重新折叠, 制备具有新型功能的蛋白质. 所以, 人们预测蛋白质工程将是体外无细胞系统最具前景的应用领域.

2 CFCF 系统的优势

与标准的无细胞系统相比, 一方面 CFCF 系统的反应时间明显延长, 可维持 20 ~ 100 h^[1,3,6]; 另一方面表达产物的得率大幅度提高, 一般能达到 200 ~ 300 mg/L 反应液^[3,4,7]. 与体内细胞表达系统相比, CFCF 系统具有的明显优势有: a. 表达产物是唯一的, 同时直接经超滤膜过滤流出, 故其纯度相当高, 免除了繁琐的分离纯化步骤; b. 能够表达有毒性的产物基因以及稳定性较差或者不溶性的产物基因; c. 不存在胞内蛋白酶对产物的降解, 也无细胞毒素以及当使用细菌细胞或连续细胞株表达系统时外源性 DNA 和 RNA 等对产物的污染; d. 不局限于病毒 mRNA 和编码低分子蛋白质的原核基因, 真核生物蛋白质基因也可在 CFCF 系统得到制备水平的基因表达; e. 操作相对容易, 不必中止反应, 即可得到所表达产物.

3 CFCF 系统存在的问题与疑点

尽管 CFCF 系统具有上述优点, 但它也有一些缺陷. 例如: a. 需连续不断地供给昂贵的氨基酸、ATP、GTP、磷酸肌酸及其激酶等物质, 运行费用高; b. 随着反应时间的延长, 某些蛋白质产物容易聚集在超滤膜的表面, 阻塞膜孔, 减慢流速, 直至产物的流出完全受阻; c. 有时蛋白质成分出现渗漏现象, 污染目的产物; d. 反应混合液中的一些低分子质量物质如翻译起始因子、tRNAs 有流失的可能, 在一定的程度上会影响系统的翻译活性; e. mRNA 容易发生降解, 寿命短, 使系统的再生能力较差;

在 CFCF 系统中, 还有一些非常有趣而又未能合理解释的现象. 如在表达产物经超滤膜滤出的同时, 必然会有一些抑制性的低分子质量物质或它们的衍生物如核苷酸, 磷酸也被连续去除; 无细胞提取液中的一些调节因子也将消耗殆尽; 新合成的多肽产物因不断被滤出反应系统始终处于一个较低的浓度, 而无法对核糖体形成反馈抑制等. 它们对 CFCF 系统是否产生影响, 目前还不十分明确.

另一有趣的现象是 CFCF 系统在较长时间 (至少在 10~ 20 h) 运行过程中, mRNA 模板却又呈现出良好的稳定性, 似乎它对存在于各种无细胞提取液中的磷酸二酯酶 (尽管水平很低) 有抗性^[3]. 人们推测很可能是 mRNA 同核糖体和其他翻译成分持续性结合成一个复合体, 从而增加了它在反应过程中的稳定性, 只是缺乏足够的试验证据.

此外, CFCF 系统的超滤膜, 一般为美国 Amicon 公司的 PM10 或 XM30-YM100 或 XM300. 理论上讲, 一些小分子质量的物质是可以通过的. 但令人费解的是, 即使使用 YM100 或 XM300 超滤膜, 滤液中 tRNAs 和蛋白起始因子等小分子物质的含量却非常低. 说明这些重要的小分子物质并没有象人们所预料的那样发生流失, 而是绝大部分都停留在 CFCF 系统中^[5]. 那末, 是何种机制使这些本

该透过超滤膜的小分子物质没有发生流失呢?其原因可能是 tRNAs 和蛋白起始因子与其他的翻译成分构成了一个大的动态的复合体,并不是以个体分子形式存在的,因而也就不能透过超滤膜.

4 CFCF 系统的改进与完善

近年来,随着一些生物化学和分子生物学技术被引入 CFCF 系统,相继出现了固定化的 CFCF 系统、耦联转录-翻译的 CFCF 系统以及与 PCR 技术相结合的 CFCF 系统等,使体外无细胞系统得到大大改进与完善.

4.1 固定化的 CFCF 系统

在无细胞系统中, mRNA 只被翻译几次,相反,在细胞内它却可重复翻译,因而如何提高 mRNA 的稳定性和重复利用性是建立高效的 CFCF 系统的必需条件之一. Kobatake 等^[8]利用 3 端的 poly (A) 尾通过杂交方法,将 mRNA 或 poly (U) 固定在寡聚 (dT) 纤维素基质上,不但可以提高稳定性,而且可使 mRNA 得到重复利用,降低成本.此外,核糖体也可以固定化,甚至还有将整个无细胞系统借助物理性手段固定在微胶囊中的报道.

4.2 耦联转录-翻译的 CFCF 系统

根据细菌无细胞提取液具有完整的转录-翻译活性的特点,利用 *E. coli* S30 建立了耦联转录-翻译的 CFCF 系统.即将目的蛋白编码基因和一个选择标记基因同适宜的质粒相连接,加入 *E. coli* S30 提取液中,借助内源性的 RNA 聚合酶及其启动子,使目的蛋白基因得以表达.然而,由于选择标记基因也一同被表达,导致了两种表达产物的弊端;另一种缺陷就是仅限于原核细胞提取液^[3].

但由于 SP6 和 T7RNA 聚合酶能有效地将质粒 DNA 或合成的基因转录成 mRNA,使外源基因在真核细胞提取液能翻译成相应的多肽和蛋白质,只是由于体外转录与体外翻译的条件相差较大,从而较难提供一个共同的适宜条件.但不管怎样,利用耦联转录-翻译的 CFCF 系统,已使许多带有不同目的基因的质粒

DNA 在多种类型 CFCF 系统得到制备水平的基因表达^[3,8~11].

4.3 转录-翻译的基因扩增

即目的基因片段 → PCR 扩增 cDNA → T7 或 SP6RNA 聚合酶体外转录 → 体外 CFCF 系统翻译.其优点是, T7RNA 聚合酶指导下得到的 mRNA 转录子 (即使不纯化) 在 CFCF 系统中也可得到制备水平的表达.例如每个二氢叶酸还原酶编码基因的质粒 DNA 可得到 10^9 蛋白质分子的拷贝数^[10].但有报道 PCR 扩增得到的 cDNA 可能含有影响 mRNA 翻译的抑制剂,导致一些不完整的或降解的多肽产物.

4.4 翻译成分的纯化

无细胞提取液经进一步纯化或浓缩,可提高系统的表达能力或翻译效率^[3,11].如 *E. coli* S30 提取液经超离心后,得到含纯净核糖体片段和必需的蛋白质因子的无细胞系统,不仅翻译效率得到提高,而且带有目的基因编码序列的质粒 DNA,不必线性化,即可在耦联转录-翻译的 CFCF 系统中有效表达.

4.5 CFCF 系统的改进

根据 Spirin 等的 CFCF 系统,两种新型的 CFCF 系统相继被建立^[3,12].前者用微型超滤柱代替 Amicon8MC,超滤膜置于出口,调节器位于入口,采用水套管式柱控制温度,反应混合液的体积由调节器设定以保证无空气层存在.然后,将整个柱体倒置,即膜朝上,调节器朝下,这样当比重轻的供给液从底部进入比重重的反应混合液中时,会导致对流混合,故不用搅拌,更重要的是膜朝上,不易发生阻塞.后者是用反应室代替 Amicon8MC,反应室的体积等于反应混合液的体积,以保证无空气层存在,用 HPLC 泵代替一般的蠕动泵.其优点是,即使使用粘性大的 *E. coli* S30 提取液,也能非常有效地维持恒定的流速.

5 结束语

随着 CFCF 系统的不断改进与完善,我们相信它在制备那些在体内细胞表达水平低的多

肽或蛋白质、有毒性的、或细胞内不稳定的多肽和蛋白质以及具有高附加值的药用多肽等方面具有的巨大潜在价值, 将逐渐得到开发应用。此外, 在疫苗制备上, CFCF 系统将因表达产物的专一性和纯净性比体内表达系统具有更大的优越性。因为在临床上应用的疫苗必须保证纯度, 否则, 会引起过敏症。

总之, CFCF 系统为生命科学和生物技术开辟了一个新领域, 预计, 它很有可能成为遗传工程中构建工程菌的替代方法。

参 考 文 献

- 1 Spirin A S, Baranov V I, Ryabova L A *et al.* A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, 1988, **242** (4882): 1162~ 1164
- 2 Zubay G. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet*, 1973, **7**: 267~ 287
- 3 Baranov V I, Spirin A S. Gene expression in cell-free system in preparative scale. *Methods in Enzymology*, 1993, **217**: 123~ 142
- 4 Ryranov L A, Ortlepp S A, Baranov V I. Preparative synthesis of globin in a continuous cell-free translation system from rabbit reticulocytes. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (11): 4412~ 4418
- 5 Kolosov L A, Kolosova I M, Alakhov V Y *et al.* Preparative synthesis of bioactive human interleukin-2 in a continuous flow translation system. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, **6** (2): 125~ 133
- 6 Marszal E, Suchova M, Konecny P *et al.* Study of cell-free protein synthesis in aqueous two-phase systems. *J Mol Recog*, 1995, **8** (1): 151~ 156
- 7 Baranov V I, Morozov I Y, Ortlepp S A *et al.* Gene expression in cell-free system in preparative scale. *Gene*, 1989, **84** (2): 463~ 466
- 8 Tulin E E, Tsutsumi K I, Ejiri S I *et al.* Continuous coupled transcription-translation system for the production of rice cytoplasmic aldolase. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **45**

(6): 511~ 516

- 9 Kobatake E I, Kariyama Y, Aizawa M. Translation of immobilizing genetic information by yeast cell-free protein synthesizing system. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **37** (6): 723~ 728
- 10 Resto E, Lida A, Van M D *et al.* Amplification of protein expression in a cell-free system. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (22): 5979~ 5983
- 11 Craig D, Howell M T, Gidds C L *et al.* Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a eukaryotic *in vitro* transcription-translation system. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (19): 4987~ 4995
- 12 Kigawa T, Yokoyama S. A continuous cell-free protein synthesis system for coupled transcription-translation. *J Biochem*, 1991, **110** (2): 166~ 168

Gene Expression and Protein Synthesis in Cell-free Systems. WANG Jing-lin, GAO Pei-ji (*The State key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China*).

Abstract Cell-free translation: the *in vitro* synthesis of protein using cellular extracts has been a routine technique in molecular biology labs for twenty years. But it has seldom studied in our country. The characteristics including types, preparation, basics, functions and progress of cell-free systems are introduced. Its advantages and disadvantages are also discussed. It is beneficial for the application and understanding of the technique by our researchers in applied biochemistry and molecular biology assays.

Key words cell-free system, gene expression, protein synthesis

NHE 基因家族的研究进展

黄桂君 钱桂生

(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

摘要 Na^+/H^+ 交换泵 (Na^+/H^+ exchanger, NHE) 是存在于所有脊椎动物细胞中的重要跨膜蛋白,

收稿日期: 1997-06-13, 修回日期: 1997-12-08