

膜蛋白的表达：在无细胞体系中实现 功能性表达、折叠和组装

李剑勇 满亚辉 陈 倩 裴 迪 吴文健*

(国防科技大学理学院化学与生物学系, 长沙 410000)

摘要 膜蛋白在人类和其他物种的生命活动中都起着至关重要的作用。在已完成测序的基因组中, 膜蛋白占据 30%。药物作用靶向位点、细胞之间的信号传递以及对外界环境的探测等功能, 大多是通过生物膜上的特殊膜受体蛋白实现的。膜蛋白研究在工业、环境、国防、医学等领域具有重大意义。嗅觉受体蛋白是一类典型的膜蛋白, 属于 G 蛋白偶联受体家族。嗅觉受体蛋白调控着生物的食物寻找、危险趋避和求偶行为。其主要分布于脊椎动物鼻腔和昆虫触角。嗅觉受体蛋白可以直接识别气味分子, 将生物信号转化为电信号, 最终传递至神经中枢, 进而做出相关应答。膜蛋白的获取并不容易。天然组织中的膜蛋白含量太低不足以支撑学术研究。异源表达难以实现膜蛋白整合上膜, 这给膜蛋白的结构和功能研究带来很大挑战。无细胞蛋白质合成系统是一个开放体系, 且不依赖细胞活性, 是体外表达蛋白质的有效方法。通过无细胞蛋白合成体系, 在体外实现膜蛋白二聚体的自组装, 将为膜蛋白研究带来全新突破。本文总结了用于无细胞表达的膜蛋白研究进展。

关键词 嗅觉受体蛋白, 无细胞蛋白质合成系统, 膜蛋白, 生物传感, 信号传导

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0372

1 膜蛋白结构和功能

1.1 膜蛋白分类

细胞膜为细胞提供了一把保护伞, 不仅保证了细胞内各种生理反应有序进行, 也实现了物质、能量和信号的正常传导。大部分功能依靠细胞膜上的膜蛋白(membrane proteins, MPs)完成。膜蛋白(图 1)是指能够结合或者整合到细胞或者细胞器的膜上的蛋白质总称。

膜蛋白的分类方法有多种, 根据其结构组成, 可分为 1 次跨膜结构的简单膜蛋白, 以及多次跨膜的复杂膜蛋白, 又可据其结构性能特点, 分为可溶性球状蛋白、纤维蛋白和无序蛋白等类型^[1]。复杂膜蛋白包括受体蛋白、离子通道蛋白、转运蛋白^[2]。根据与膜结合的程度以及在膜上的定位不同, 可以将膜蛋白分为外周膜蛋白、整合膜蛋白和脂锚定蛋白^[3]。整合膜蛋白表面兼具有亲水性和疏水性的氨基酸基团, 前者与生物膜的磷脂亲水基相结合, 暴

露在细胞膜的外在表面, 后者包埋于磷脂双层的疏水区域。整合膜蛋白与膜结合非常紧密, 一般只有表面活性剂或温和变性剂使膜溶解后才可分离出来^[4]。外周膜蛋白表面仅有亲水性氨基酸基团, 附着在细胞膜的内外表面, 通过离子键、氢键和磷脂分子的极性头部相结合, 或通过与内在蛋白的互相作用, 间接与膜结合, 因此只要改变溶液的离子强度甚至是提高温度就可以从膜上分离下来, 膜结构并不被破坏^[3,5]。脂锚定蛋白是通过共价键被锚定在膜的蛋白质, 通常位于脂双层外侧。

1.2 膜蛋白的功能和研究意义

膜蛋白功能丰富, 参与细胞诸多的重要反应, 包括作为载体将物质转运进出细胞, 作为激素的专一受体, 或者承载着细胞的识别功能, 以及负责信

* 通讯联系人。

Tel: 0731-84574247, E-mail: wjwu67@126.com

收稿日期: 2017-10-17, 接受日期: 2018-01-09

号传导和细胞间的相互作用^[2]。在神经细胞生长锥向神经突触转化的过程中,膜蛋白表达量明显增多^[6]。膜蛋白参与调节人体血压,肾脏的共转运因子 NKCC2 直接受膜蛋白 VAMP3 调控,进而调控血压^[7]。膜蛋白在生命活动中扮演至关重要的作用,当配体分子与膜蛋白感受器结合以后,会激发一系列反应,最终把化学信号转换成电信号,传递给神经系统,最后做出相应指令。在细胞信号通路中起作用的蛋白质主要是膜蛋白,典型范例为拥有 7 次跨膜结构的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)^[8-9]。每个 GPCR 可以被特异的

配体识别并结合,这些配体包括小分子的儿茶酚胺、脂质和神经递质以及大分子的激素^[10]。

在所有已测序的基因组中,膜蛋白占大约 30%^[11]。大约 50%药物的靶向分子属于膜蛋白^[12],膜蛋白的重要性不言而喻。膜蛋白由于具有极其重要的生物学和医学意义,其研究已经成为蛋白质科学、结构生物学以及医学药学领域的重要部分,同时也是仿生膜以及仿生传感技术等工程领域的研究基础,在工业、环境、国防等研究领域都有重要的理论和应用价值。

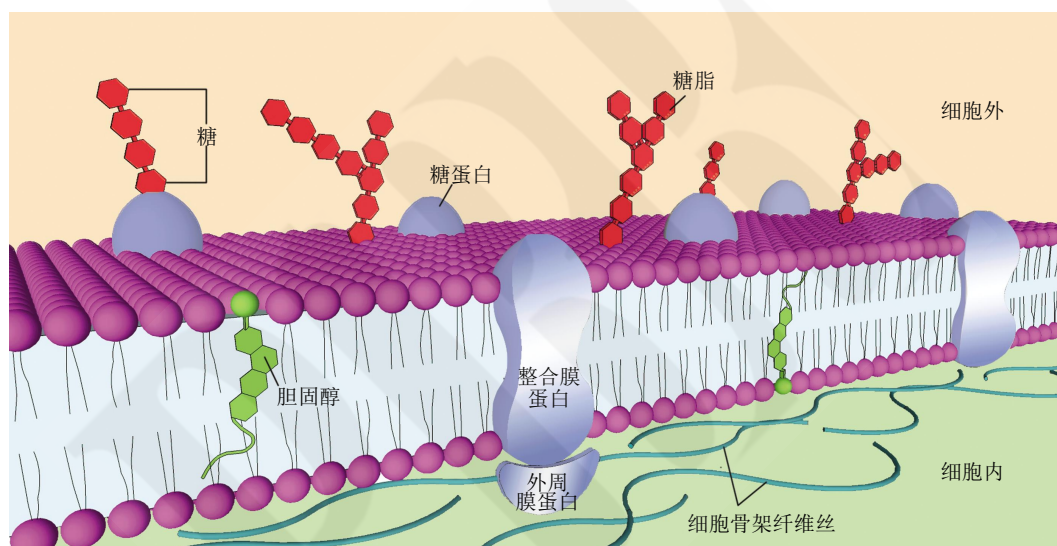


Fig. 1 Distribution of membrane proteins in cell membrane

图 1 膜蛋白在细胞膜上的分布

2 膜蛋白的生物体内合成

膜蛋白的生物体内合成包括两个部分:蛋白质的表达,以及后续的生物膜上定位和装配,而异源表达难以实现膜蛋白的定位与装配。膜蛋白的分选途径为共翻译转运途径,完成最终定位需要经过 4 个阶段:核糖体上开始合成、内质网(endoplasmic reticulum, ER)中完成合成、高尔基体(golgi complex)中加工、整合到细胞膜上(图 2)。

在生物体内,膜蛋白翻译的起始场所在游离核糖体上,起先表达的序列为蛋白质 N 端的信号肽。信号肽是位于新合成肽链 N 端的一段序列,

其作用为引导肽链定位和整合到细胞膜,通常由 13~35 个氨基酸组成^[13-14]。

当信号肽序列裸露出来后,被细胞内游离的信号肽识别颗粒(signal recognition particle, SRP)结合,导致翻译暂停。SRP 与内质网膜上的停泊蛋白(docking protein, DP)结合,将核糖体迁移至内质网膜周围,翻译重新开启^[15-17]。信号肽进入内质网里面,肽链继续延伸并穿膜,而后完成翻译,在肽链合成结束以前信号肽被切除。新合成的肽链与内质网膜上的整合蛋白 v-SNARE 以及包被蛋白 II(coater protein II, COP II)形成复合体,并召集 COP II 亚基,最终形成 COP II 有被小泡^[18]。

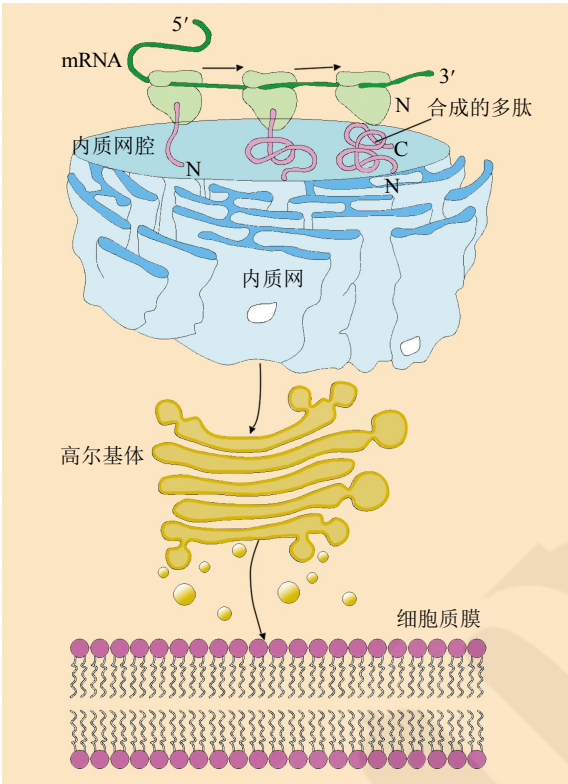


Fig. 2 Membrane proteins synthesis in vivo
图 2 膜蛋白的生物体内合成途径

COP II 有被小泡离开内质网, 通过 v-SNARE 与高尔基体上的 t-SNARE 配对进行定位, 将新合成的肽链转移到高尔基体内^[19-21]. 高尔基体中, 在小 GTP 结合蛋白 ARF1 的作用下, 结合素蛋白被召集到反面高尔基体管网(TGN)面, 并驱动出芽, 形成网格蛋白有被小泡^[22].

发动蛋白围绕网格蛋白有被小泡颈部聚合, 催化 GTP 水解, 携带有目标膜蛋白的网格蛋白有被小泡从 TGN 释放, 最终整合到细胞质膜中^[23].

3 膜蛋白的异源表达现状和瓶颈

生物膜上的膜蛋白水平一般较低, 而膜上组成成分单一的膜蛋白种类又很少存在, 因此直接在天然生物环境中难以获得足够量的膜蛋白. 如何获得功能性膜蛋白一直是该领域研究的难点与重点. 目前而言, 其结构和功能研究主要依赖于大肠杆菌或其他系统进行重组蛋白过量的异源表达(表 1). Mysling 等^[24]利用果蝇异源表达人类内皮膜蛋白 GPHBP1, 并验证其使脂蛋白脂肪酶具备稳定活性的机制. Wang 等^[25]通过大肠杆菌异源表达外周蛋白 A, 发现其能够形成二聚物并结合肽聚糖, 在抵抗酸性和高渗透压等不良环境起到重要作用.

Table 1 Heterologous expression of membrane proteins
表 1 膜蛋白的异源表达

膜蛋白	宿主	来源	融合肽	参考文献
拟南芥叶保护细胞 K ⁺ 通道蛋白	HEK-293	拟南芥	EmGFP	[26]
人类嗅觉受体蛋白 1A1	HEK-293	人类	FLAG	[27]
单羧酸转运蛋白	大鼠	人类	-	[28]
钠钾钙交换蛋白	小鼠	人类	-	[29]
生长抑素受体蛋白亚型 2	酵母	人类	Eluc	[30]
人类大麻受体蛋白 2	Sf ₉	人类	FLAG	[31]
Pyrokinin 受体蛋白	Sf ₉	果蝇	V5	[32]
视紫红质	<i>E.coli</i>	细菌	-	[33]
顶端膜抗蛋白	<i>E.coli</i>	昆虫	-	[34]
病毒蛋白 U	<i>E.coli</i>	病毒	PelB	[35]

膜蛋白定位、转运以及顺利整合上膜等关键过程都是膜蛋白研究的瓶颈^[36-37]. 膜蛋白尤其是复杂膜蛋白的大量制备仍然是现有体内蛋白质表达技术难以攻克的难关之一. 由于实验条件下难以维持膜蛋白正确构象, 导致膜蛋白的三维结构以及动力学解析严重不足^[38]. 直到 2000 年, 人们第一次解析

出哺乳动物 GPCR 的三维结构——牛视紫红质^[39]. 7 年过后, 才首次成功解析人体 GPCR 的三维结构——2R4R 和 2R4S^[40]. 2016 年, Gu 等^[41]解析出了大肠杆菌外周膜蛋白的 β 折叠组装机制. 根据 Protein Data Bank (PDB 数据库 <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), 膜蛋白三维结构的解析远

远落后于可溶性蛋白,截至2017年10月3日,仅有1192个膜蛋白的空间结构被解析,而解析的其他蛋白质总共有125463个,膜蛋白仅占1%。因此,深入而系统地开展膜蛋白的高效表达和应用研究具有重要的理论意义和实际应用价值。

大量异源表达的膜蛋白插入到细胞膜上,会破坏宿主细胞质膜的磷脂双分子层结构,影响流动镶嵌型从而导致细胞裂解^[42]。此外,过量表达的异源膜蛋白会抢占宿主细胞中的膜蛋白结合因子,干扰宿主细胞自身膜蛋白的分选途径^[43]。与其他蛋白质相比较,外源膜蛋白本身和其所在质粒往往对宿主有更大毒性^[43]。有的膜蛋白基因含有稀有密码子,不能被宿主细胞识别,导致多肽链合成不完全,从而不能形成功能性膜蛋白^[44]。由于膜蛋白的表达、修饰和分选机制的差异,原核异源表达所面临的困难可能会更大^[45]。真核生物大部分膜蛋白的C端位于细胞质膜内,N端位于细胞质膜外,而原核异源表达的膜蛋白N端和C端均位于细胞膜内部,这可能会影响膜蛋白的定位和功能^[46-48]。膜蛋白在内质网上的糖基化修饰对其后续上膜很重要,而异源表达无法完成此过程。另外,细胞脂质膜的复杂成分限制了许多设备仪器的使用,比如圆二色谱仪、核磁共振仪等。

膜蛋白具有极强的疏水特性,而将纯化的蛋白质置于疏水环境中并不容易,目前尚缺乏功能性高效制备膜蛋白的有效方法,导致大部分膜蛋白的结构与功能还未得到透彻的解析。因此,膜蛋白的研究一直是世界级的难题。为了解决这一难题,研究者们使用了多种体外人工疏水环境,比如表面活性剂胶束、脂质体和纳米脂蛋白颗粒等^[49-50],改进蛋白质表达条件、选择更适合的宿主细胞以及优化膜蛋白的修饰和定位^[36]。这些改进有助于膜蛋白的研究,但仍然不足以支撑膜蛋白结构解析。目前而言,如何获得位于膜上且具备功能活性的膜蛋白已经成为该领域的瓶颈之一。

4 一种典型的膜蛋白:嗅觉受体蛋白

生物体在漫长的进化过程中,逐步形成了独特精细的感受机制,包括触觉、味觉和嗅觉等,这些感受机制会帮助生物体适应环境以及繁衍后代^[51]。其中,嗅觉是一套复杂的、非常灵敏的、高度特异性的感受系统,对于生物体至关重要,它会影响生物的食物探寻、危险规避、配偶觅求等行为^[52]。如果嗅觉系统受到损害,生物体的生理活动就不能正

常进行,甚至会导致生物体的无法生存。

一般而言,嗅觉感受器主要分布在脊椎动物的鼻腔或是昆虫的触角上。当气味分子与嗅觉感受器结合以后,会激发一系列反应,最终把化学信号转换成电信号,传递给神经系统,然后做出相应指令^[53]。整个嗅觉感知过程中,涉及嗅觉受体蛋白(olfactory receptors, OR)、气味分子结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、感觉神经膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)等多种分子。其中,决定气味识别的嗅觉受体蛋白OR是具有7次跨膜结构的膜蛋白。

脊椎动物的OR主要表达在嗅觉上皮组织,是一类庞大的蛋白质家族,属于GPCRs,不同物种含有的嗅觉受体基因差异很大,河豚的嗅觉受体基因最少(含有125个),最多的来自奶牛(含有2129个),而大多数脊椎动物含有的嗅觉受体基因数量介于600~1300个之间^[54]。当气味分子与感受细胞的嗅觉受体蛋白结合后,在cAMP依赖性途径中,活化的Gs α 亚基结合并激活称为腺苷酸环化酶的酶,其进而催化ATP转化为细胞内的第二信使cAMP^[55-58],这一过程会被嗅觉特异性G蛋白调节。接着,cAMP会打开环核苷酸门控的离子通道(cyclic nucleotide-gated, CNG),Ca²⁺通过该通道流入细胞内,增加细胞内Ca²⁺浓度,进而打开Cl⁻通道(calcium-dependent chloride channel)并使Cl⁻外流,进一步促进细胞的极化^[59-62],从而形成信息感受与传递,最终产生嗅觉(图3)。

昆虫嗅觉受体蛋白主要表达在触角上,其嗅觉信号传递独立于GPCRs。嗅觉受体蛋白自身形成复合物,该复合物既可以识别气味分子,也作为气味分子门控的离子通道^[63-64]。昆虫嗅觉受体蛋白的C端在细胞膜外,N端在细胞膜内,这与脊椎动物嗅觉受体蛋白拓扑学结构刚好相反^[47-48]。昆虫的嗅觉受体蛋白复合物主要由嗅觉受体蛋白和OR83b组成,其中,OR83b往往作为伴侣蛋白发挥作用^[65]。当气味分子和嗅觉受体蛋白结合后,嗅觉受体蛋白和OR83b形成的离子通道打开,Ca²⁺流入细胞内,产生电信号(图4)。不同的嗅觉受体蛋白差异很大,负责识别不同的气味分子,一个嗅觉受体神经元(olfactory receptor neurons, ORNs)通常只表达一种嗅觉受体蛋白,识别特定的气味。而OR83b在各物种中具有高度保守性,常常与嗅觉受体蛋白共表达^[65-67]。模式生物果蝇的嗅觉受体蛋白受到研究者

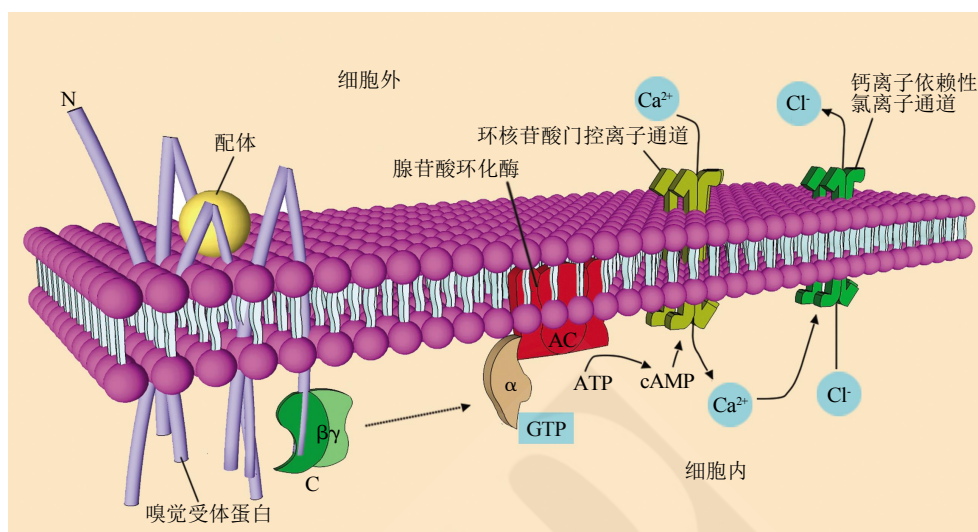


Fig. 3 Vertebrate olfactory receptor proteins signaling pathway

图 3 脊椎动物嗅觉受体蛋白信号通路

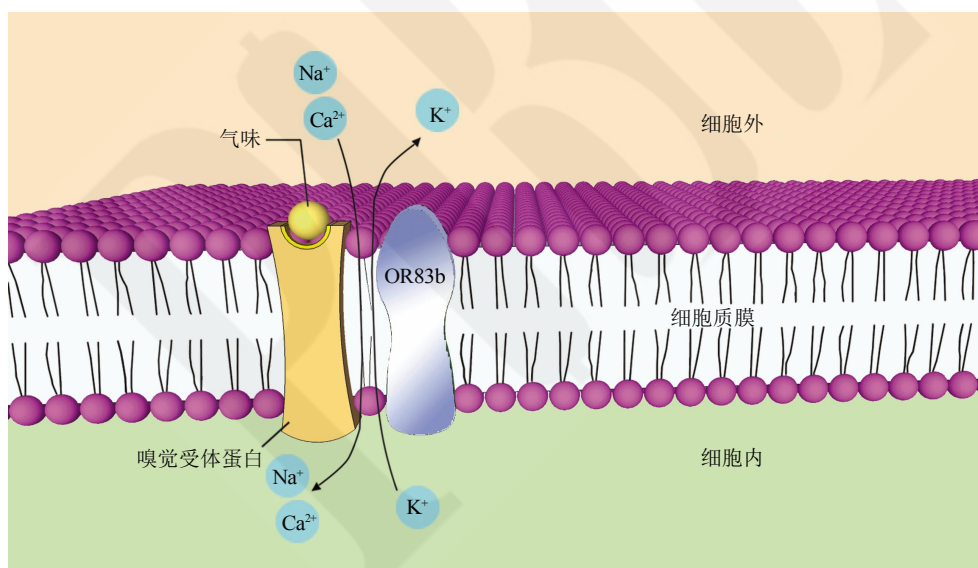


Fig. 4 Insects' olfactory receptor proteins signaling pathway

图 4 昆虫嗅觉受体信号通路

们的青睐,截至 2017 年 1 月在 DoOR 数据库中已经发布了 78 种果蝇嗅觉受体蛋白质^[68].

获取嗅觉受体蛋白的方法主要分为两种:一是从组织或器官中直接提取;另一个是采用异源表达,这也是目前最主流的蛋白质获取方式.生物膜上的嗅觉受体蛋白水平一般较低,直接在天然生物环境中难以获得足够量的蛋白.如何获得功能性嗅觉受体蛋白一直是该领域研究的难点与重点.目前,异源表达有少数成功例子,例如,通过大肠杆菌、酵母或者昆虫表达嗅觉受体蛋白 hOR2AG1、

Olf226 和 ODR10 等^[69].但是,这些异源表达的嗅觉受体蛋白大部分由于错误折叠导致不具备生物活性,且表达效率非常低.嗅觉受体蛋白的异源表达会破坏宿主细胞的细胞质膜结构、影响流动镶嵌型、严重干扰宿主细胞本身的新陈代谢、无法顺利定位于细胞膜.而无细胞蛋白质合成体系(cell-free protein synthesis system, CFPS)由于开放性和不受细胞生命活性的影响,可以避免异源表达存在的以上问题^[70-73].

5 CFPS 特点以及对膜蛋白合成的优势

CFPS 是一种在体外合成蛋白质的体系, 该体系主要依靠 mRNA 或者 DNA 为模板, 在细胞提取物的酶系作用下完成蛋白质合成^[74]. CFPS 的模板可以是线性的, 也可以是环形质粒. 通过额外添加的 T7RNA 聚合酶来调控转录. T7RNA 聚合酶的表达过程已被充分探究.

CFPS 是一种经典的蛋白质合成技术方法, 在 1964 年, Nirenberg 等^[75]借此解密三联密码子, 进而拉开了 CFPS 和密码子的研究序幕. 之后, CFPS 一直是分子生物学、蛋白质组学、生物工程等领域的热点. 在接下来的几十年里, 研究者们逐步优化和改进反应条件, 使该体系日渐成熟, 成为表达蛋白质的高效工具. 这些改进包括在体系中连续添加细胞提取物和能量物质、改进细胞提取物制备方法等^[76-77]. 在 N 端添加短序列的表达标签可以明显提高表达产量. 无细胞体系中的细胞提取物有多种来源, 根据这种差异, 可以分为原核无细胞体系和真核无细胞体系, 不同提取物表达蛋白质的特性不同^[74]. 原核无细胞体系主要包括大肠杆菌无细胞体系、嗜热菌无细胞体系^[78-79], 其中大肠杆菌无细胞合成体系是应用最多的体系之一. 许多的 GPCR 通过大肠杆菌裂解物合成, 都已经被证明了. 真核无细胞体系主要包括兔网织红细胞裂解物系统和麦胚提取物系统^[80-81].

CFPS 其实就是将用于基因表达的异源细胞体破碎形成胞浆, 这样就没有了细胞的生命限制, 也消除了细胞膜的阻隔, 但蛋白质合成所需的主要功能均存在, 包括体现中心法则的 DNA→mRNA→

蛋白质. 另外, 与异源表达技术不同, 外源目的基因可以采用线性模板, 甚至直接使用 mRNA. 由于不需要活细胞, 不受细胞生长代谢和内源蛋白酶的影响, 可以避免细胞毒性、蛋白质定位紊乱和细胞膜提取困难等问题^[82]. 就浓度而言, 无细胞表达最高可达 6 000 mg/L, 这一数值比活细胞异源表达高出许多^[69, 83-85].

CFPS 的开放性, 使目的蛋白质标签的添加变得更加容易, 直接在体系中添加带有标签的氨基酸即可^[86-87]. 除了开放性和独立于细胞生命活性特征外, CFPS 与传统的异源宿主表达的方法相比, 也具有体积小、蛋白质产量高以及便于操作的优势^[76, 84, 88-90]. CFPS 表达膜蛋白的过程直接在反应液里完成, 这与生物体内表达有明显不同. CFPS 的上述优势大大推动了蛋白质的研究, 比如双特异性抗体 KIH、人类 MEK1 激酶、多种功能性膜蛋白^[91-93](表 2).

由于嗅觉受体蛋白属于膜蛋白, 具有强烈的疏水性以及复杂的结构, 因而阻碍上膜装配的过程, 这给嗅觉受体蛋白的研究带来很大的挑战^[94]. 尽管嗅觉受体蛋白的表达十分艰难, 但近年来陆续有研究者通过 CFPS 的显著优势, 利用表面活性剂解决其疏水性问题, 成功实现了少数种类嗅觉受体蛋白的体外表达, 溶解度可达 80%以上^[95], 而活细胞异源表达出来的嗅觉受体蛋白几乎不溶解.

2008 年, Kaiser 等^[96]使用麦胚提取物, 在表面活性剂的帮助下, 成功表达出可溶性人体嗅觉受体蛋白 hOR17-4. 除了麦芽胚提取物系统, 大肠杆菌提取物系统也受到广大研究者的青睐. 2014 年, Zhang 等^[83]利用大肠杆菌 CFPS 成功合成线虫嗅觉

Table 2 Cell-free synthesis of membrane proteins

表 2 膜蛋白的无细胞表达

膜蛋白	来源	检测	参考文献
嗅觉受体蛋白 OR67a、OR85b 和 ORCO	果蝇	配体验证	[97]
棒状蛋白 4	疟原虫	Alpha 筛选	[98]
电压依赖性阴离子通道蛋白 3	拟南芥	电生理	[99]
植物受体蛋白	拟南芥	活性	[100]
K ⁺ 通道蛋白	细菌	活性	[101]
转运蛋白 MraY	细菌	活性	[102]
通道蛋白 SecYEG	细菌	酶活	[103]
转运蛋白 BOT1	植物	-	[104]
凋亡诱导的人类跨膜蛋白	人类	活性	[105]
非结构蛋白 4B	病毒	活性	[106]

受体蛋白 ODR-10. 值得一提的是, 据报道称, 有研究者使用大肠杆菌 CFPS 首次表达出昆虫嗅觉受体蛋白 DmOR67a、DmOR85b、DmOR83B, 浓度达到 100 mg/L, 圆二色谱法结果表明, 表达出来的嗅觉受体蛋白均为 α 螺旋并且折叠正确, 微热泳仪结果表明, 蛋白质可以识别相应的气味分子, 为功能性蛋白^[97], 但没有对其上膜的表述与测试. 其中, 截至目前文献记载, 昆虫 DmOR67a 和 DmOR85b 是第一次被成功表达出来, DmOR83B 也是第一次被大肠杆菌 CFPS 表达出来, 这说明 CFPS 具有表达多种蛋白的潜力, 甚至是其他方法未曾表达出来的蛋白质. 除此以外, 大鼠嗅觉受体蛋白也被报道可以用 CFPS 表达. 研究者们使用商业化的大肠杆菌提取物 CFPS 成功表达出大鼠嗅觉受体蛋白 mOR33-1、mOR103-1、mOR106-13、mOR174-4、mOR174-9、mOR175-1^[95].

嗅觉受体蛋白作为重要的膜蛋白, 需要伴侣蛋白和嗅觉受体蛋白进行联合作用, 形成二聚体蛋白的复合门控通道. 由于无细胞体系的开放性优势, 便于控制和优化反应条件, 联合脂质体和脂纳米盘技术, 可以实现体外高效表达膜蛋白, 并实现二聚体上膜. 二聚体复合物识别并传递信号, 将会大大推动膜蛋白参与的调控机制探索.

二聚体的组装主要有三种方式, 常见的方式为将膜蛋白表达模板按一定比例混合, 在无细胞体系中翻译成蛋白质, 在表达过程中实现同步自组装. 第二种方式, 先将一种膜蛋白表达于脂质体膜上, 然后再将另一种膜蛋白与之复合, 最终形成功能性二聚物. 第三种, 可以将两种膜蛋白进行融合表达, 然后定位于脂质体中. 目前膜蛋白二聚体上膜研究已经拉开序幕. 于 2016 年, GPCR 家族成员趋化因子受体蛋白 (chemokine receptor type4, CXCR4), 已经被证实可实现体外二聚体组装上膜. 在胆固醇的作用下, 位于棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC) 环境中的 2 个 CXCR4 蛋白通过跨膜区域 3 和 4 相互结合, 并形成功能性二聚体. 有趣的是, 在没有胆固醇的作用下, CXCR4 依然会形成二聚体或者多聚体, 但不具备功能活性^[107]. 另外, 内囊体光保护蛋白 (photosystem II subunit S, PsbS) 被证明在表面活性剂十二烷基胆碱磷酸 FC-12 作用下, 低 pH 脂质体中更易形成二聚体. 该二聚体通过圆二色谱 (circular dichroism, CD)、动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 以及核磁共振

(nuclear magnetic resonance, NMR) 验证其具备正确的构象和功能^[108]. 膜蛋白自身特定结构也有利于二聚体上膜, N 端尾巴有助于人体核酸内切酶 III (human endonuclease III, hDNase III) 在体外形成二聚体^[109]. 通过无细胞体系, 肝素结合上皮生长因子 (heparin-binding epithelial growth factor like factor, Hb-EGF) 和内皮素受体 (endothelin receptor, ETB) 都可以与巨大单膜泡 (giant unilamellar vesicles, GUVs) 进行组装^[70]. 有研究发现, 牛乳头瘤病毒 E5 蛋白作为跨膜蛋白, 通过 FC-12 作用, 可在脂质体二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC) 中形成二聚体. CD 表明 E5 蛋白质具有典型的二级结构—— α 螺旋. 线性二相色谱 (linear dichroism spectroscopy, LD) 表明该二聚体与脂质体膜成功组装^[110].

无细胞的开放体系, 不仅可以修饰人工脂质膜的组分, 也可以修饰膜蛋白的构象, 使得功能性二聚体的折叠和组装得以实现.

6 CFPS 合成功能性膜蛋白的展望

虽然研究报道称可溶状态下的嗅觉受体蛋白也具备一定生理活性, 但只有成功整合在膜上, 具有正确折叠构象的蛋白才能成为真正意义上的功能性膜蛋白. 异源表达中, 膜蛋白的强烈疏水性严重阻碍了膜蛋白的上膜过程. 如果能够实现体外膜蛋白的自组装以及二聚物形成, 将会是膜蛋白结构和功能研究的一大突破.

为了解决膜蛋白的上膜难题, 本课题选取 Canton-S 果蝇的嗅觉受体蛋白 OR83b、OR7a 和 OR42a 作为研究对象, 探索用于膜蛋白表达的无细胞表达体系. 成功表达出嗅觉受体蛋白质 OR83b、OR7a 和 OR42a, 最高表达量达到 313 mg/L, 并探索出最佳可溶表面活性剂 Brij35, 最高可溶表达量 148 mg/L, 实现了膜蛋白的高效上膜表达. 我们构建了用于无细胞表达的 PCR 线性模板以及 pIVEX 重组质粒模板. 通过无细胞系统表达完成以后利用 Western blot 进行检验 (图 5).

为了进一步研究膜蛋白的上膜表达, 我们拟定的研究思路如下:

a. 研发适合于膜蛋白合成的无细胞体系

传统异源表达系统表达膜蛋白存在极大的挑战, 目前为数不多的几例膜蛋白的表达, 均存在膜蛋白上膜困难、不具有生物活性, 严重阻碍了膜蛋白结构解析和功能研究. 本课题打算利用 CFPS 的

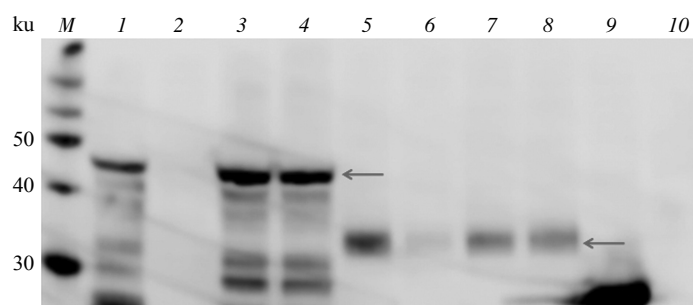


Fig. 5 Soluble expression of OR83b and OR42a

图5 OR83b 和 OR42a 的可溶性表达

箭头表示目标膜蛋白位置, 蛋白质印迹表明表面活性剂 Brij35 有助于 OR83b 和 OR42a 的溶解. M: 蛋白质分子质量标准; 1: OR83b 总蛋白; 2: OR83b 可溶性蛋白; 3: 添加 Brij 以后的 OR83b 总蛋白; 4: 添加 Brij 以后的 OR83b 可溶性蛋白; 5~8: OR42a(对应 OR83b); 9: 阳性对照; 10: 阴性对照.

不依赖细胞活性和开放性, 通过对无细胞体系表达模板的改造、无细胞组分的优化以及合成过程的控制来研发适合于膜蛋白表达的无细胞体系.

b. 膜蛋白和生物膜同步自组装

只有整合在生物膜上的膜蛋白才能充分发挥其功能, 而传统异源表达的膜蛋白通常后期无法顺利上膜, 导致很难具备生物活性. 本课题拟通过无细胞体系中膜蛋白和生物膜同步自组装, 形成膜蛋白整合生物膜的复合物. 通过脂质体技术和无细胞体系的联合, 实现生物膜合成和膜蛋白合成的同步, 实现膜蛋白自组装上膜的目标.

c. 标准化和模块化生物制造膜蛋白

以昆虫嗅觉受体 OR83b、OR7a 和 OR42a 为研究对象, 探索适合功能性膜蛋白合成的 CFPS. 然后用此体系合成脊椎动物的嗅觉受体膜蛋白和其他众多类型的膜蛋白.

7 前景展望

CFPS 是一种可以高效快速表达外源蛋白质的系统, 对于嗅觉受体蛋白的表达也具有诸多优势. 嗅觉受体蛋白作为重要的功能性膜蛋白, 其表达难度大, 目前仍未有任何嗅觉受体蛋白获得晶体结构的解析. 而 CFPS 开放性、独立于细胞生命活性、高效、省时、便于操作的优势为包括嗅觉受体蛋白在内的重要功能性膜蛋白的研究提供了极大的便利^[11].

获得大量嗅觉受体蛋白的活性表达, 并能够实现上膜装配, 是对其进一步开展结构和功能研究的重要前提. 上述研究将有利于深入解析生物体的嗅

觉机制, 并将促进仿生嗅觉传感器的研发, 也可用于药物定位和开发、环境保护和农业等各领域.

致谢 感谢韩国忠南大学 KIM Dong-Myung 教授提供的无细胞表达体系并给予细致的研究指导.

参 考 文 献

- [1] Andreeva A, Howorth D, Chothia C, *et al.* SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(Database issue): D310-314
- [2] Almen M S, Nordstrom K J, Fredriksson R, *et al.* Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biology*, 2009, **7**(1): 50
- [3] Johnson J E, Cornell R B. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (Review). *Molecular Membrane Biology*, 2009, **16**(3): 217-235
- [4] Erik W, Gunnar V H. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science*, 1998, **7**(4): 1029-1038
- [5] Goñi F M. Non-permanent proteins in membranes: when proteins come as visitors (Review). *Molecular Membrane Biology*, 2002, **19**(4): 237-245
- [6] Zhang K X, Tan L, Pellegrini M, *et al.* Rapid changes in the transcriptome during the conversion of growth cones to synaptic terminals. *Cell Reports*, 2016, **14**(5): 1258-1271
- [7] Caceres P S, Mendez M, Haque M Z, *et al.* Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP3) mediates constitutive trafficking of the renal Co-transporter NKCC2 in thick ascending limbs: role in renal function and blood pressure. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, **291**(42): 22063-22073
- [8] Venkatakrishnan A J, Deupi X, Lebon G, *et al.* Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 2013, **494**(7436):

- 185-194
- [9] Hollenstein K, De Graaf C, Bortolato A, *et al.* Insights into the structure of class B GPCRs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014, **35**(1): 12-22
- [10] Willoughby D, Cooper D M. Organization and Ca^{2+} regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological Reviews*, 2007, **87**(3): 965-1010
- [11] Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **305**(3): 567-580
- [12] John P O, Al-Lazikani B, Hopkins A. How many drug targets are there. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, **5**(12): 993-996
- [13] Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *Journal of Cell Biology*, 1975, **67**(3): 835-851
- [14] K'Il L, Krogh A, Sonnhammer E L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology*, 2004, **338**(5): 1027-1036
- [15] Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *Journal of Cell Biology*, 1981, **91**(2 Pt 1): 551-556
- [16] Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A, *et al.* Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *Journal of Cell Biology*, 1982, **95**(2 Pt 1): 463-469
- [17] Görlich D, Prehn S, Hartmann E, *et al.* A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, 1992, **71**(3): 489-503
- [18] Barlowe C. COP II -dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, **14**: 417-422
- [19] Mancias J D, Goldberg J. Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COP II coat machinery. *Embo Journal*, 2008, **27**(21): 2918-2928
- [20] Hughes H, Stephens D J. Assembly, organization, and function of the COP II coat. *Histochemistry and Cell Biology*, 2008, **129**(2): 129-151
- [21] Lee M C, Miller E A. Molecular mechanisms of COP II vesicle formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2007, **18**(4): 424-434
- [22] Smythe E. Clathrin-coated vesicle formation: a paradigm for coated-vesicle formation. *Biochemical Society Transactions*, 2003, **31**(Pt 3): 736-739
- [23] Jahn R, Lang T, Südhof T C. Membrane fusion. *Cell*, 2003, **112**(4): 519-533
- [24] Mysling S, Kristensen K K, Larsson M, *et al.* The acidic domain of the endothelial membrane protein GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase activity by preventing unfolding of its catalytic domain. *eLife*, 2016, **5**: e12095
- [25] Wang H, Li Q, Fang Y, *et al.* Biochemical and functional characterization of the periplasmic domain of the outer membrane protein A from enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol Res*, 2016, **182**(1): 109-115
- [26] Ooi A, Wong A, Esau L, *et al.* A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in Physiology*, 2016, **7**: 300
- [27] Belloir C, Miller-Leseigneur M L, Neiers F, *et al.* Biophysical and functional characterization of the human olfactory receptor OR1A1 expressed in a mammalian inducible cell line. *Protein Expression and Purification*, 2017, **129**: 31-43
- [28] Bakar N S B, Kamali F, Brown C D A. Effect of statins on functional expression of membrane transporters in L6 rat skeletal muscle cells. *Journal of Biomedical and Clinical Sciences*, 2016, **1**(1): 17-26
- [29] Bronckers A L, Jalali R, Lytton J. Reduced protein expression of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -exchanger (SLC24A4) in apical plasma membranes of maturation ameloblasts of fluorotic mice. *Calcified Tissue International*, 2017, **100**(1): 80-86
- [30] Fukutani Y, Ishii J, Kondo A, *et al.* Split luciferase complementation assay for the analysis of G protein-coupled receptor ligand response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology & Bioengineering*, 2017, **114**(6): 1354-1361
- [31] Tiburu E K, Zhuang J, Fleischer H N, *et al.* Expression, purification, and monitoring of conformational changes of hCB2 TMH67H8 in different membrane-mimetic lipid mixtures using circular dichroism and NMR techniques. *Membranes*, 2017, **7**(1): 10
- [32] Choi M Y, Ahn S J, Kim A Y, *et al.* Identification and characterization of pyrokinin and CAPA peptides, and corresponding GPCRs from spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, **246**: 354-362
- [33] Broecker J, Eger B T, Ernst O P. Crystallography of membrane proteins mediated by polymer-bounded lipid nanodiscs. *Structure*, 2017, **25**(2): 384-392
- [34] Wang G, Efstratiou A, Adjou Moumouni P F, *et al.* Expression of truncated Babesia microti apical membrane protein 1 and rhoptry neck protein 2 and evaluation of their protective efficacy. *Experimental Parasitology*, 2017, **172**: 5-11
- [35] Deb A, Johnson W A, Kline A P, *et al.* Bacterial expression, correct membrane targeting and functional folding of the HIV-1 membrane protein Vpu using a periplasmic signal peptide. *PLoS One*, 2017, **12**(2): e0172529
- [36] Wagner S, Bader M L, Drew D, *et al.* Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology*, 2006, **24** (8): 364-371
- [37] Grishammer R. Understanding recombinant expression of membrane proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, **17**(4): 337-340
- [38] Liszewski K. Dissecting the structure of membrane proteins. *Genetic Engineering & Biotechnology News Gen*, 2015, **35**(17): 1,

- 14, 16–17
- [39] Palczewski K. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 2000, **289**(5480): 739–745
- [40] Rasmussen S G, Choi H J, Rosenbaum D M, *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2007, **450**(7168): 383–387
- [41] Gu Y, Li H, Dong H, *et al.* Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex. *Nature*, 2016, **531**(7592): 64
- [42] Tate C G. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Letters*, 2001, **28**(3): 315–422
- [43] Miroux B, Walker J E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 1996, **260**(3): 289–298
- [44] Kurland C, Gallant J. Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, **7**(5): 489–493
- [45] Kunji E R, Chan K W, Slotboom D J, *et al.* Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(5): 546–551
- [46] Von Heijne G. Membrane-protein topology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, **7**(12): 909–918
- [47] Benton R, Sachse S, Michnick S W, *et al.* Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biology*, 2006, **4**(2): e20
- [48] Lundin C, Kall L, Kreher S A, *et al.* Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. *FEBS Letters*, 2007, **581**(29): 5601–5604
- [49] Czerski L, Sanders C R. Functionality of a membrane protein in bicelles. *Analytical Biochemistry*, 2000, **284**(2): 327–333
- [50] Katzen F, Peterson T C, Kudlicki W. Membrane protein expression: no cells required. *Trends in Biotechnology*, 2009, **27**(8): 455–460
- [51] Plipfel Y, Lancet D. olfaction Good reception in fruit fly antennae. *Nature*, 1999, **398**(6725): 285–287
- [52] Field L M, Pickett J A, Wadhams J. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Molecular Biology*, 2000, **9**(6): 545
- [53] Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 1991, **65**(1): 175–187
- [54] Nei M, Niimura Y, Nozawa M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nature Reviews Genetics*, 2008, **9**(12): 951–963
- [55] Damann N, Voets T, Nilius B. TRPs in our senses. *Current Biology*, 2008, **18**(18): R880–889
- [56] Bargmann C I. Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature*, 2006, **444**(7117): 295–301
- [57] Munger S D, Leinders-Zufall T, Zufall F. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annual Review of Physiology*, 2009, **71**(1): 115–140
- [58] Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, **41**(41): 145–174
- [59] Nakamura T, Gold G H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, 1987, **325**(6103): 442–444
- [60] Nickell W T, Kleene N K, Kleene S J. Mechanisms of neuronal chloride accumulation in intact mouse olfactory epithelium. *The Journal of Physiology*, 2007, **583**(Pt 3): 1005–1020
- [61] Gilman A G. G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry*, 1987, **56**(1): 615–649
- [62] Uzman A. Essential cell biology (2nd ed). *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2004, **32**(4): 286–287
- [63] Wicher D, Schafer R, Bauernfeind R, *et al.* *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 2008, **452**(7190): 1007–1011
- [64] Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, *et al.* Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 2008, **452**(7190): 1002–1006
- [65] Larsson M C, Domingos A I, Jones W D, *et al.* Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 2004, **43**(5): 703–714
- [66] Goldman A L, Van Der Goes Van Naters W, Lessing D, *et al.* Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron*, 2005, **45**(5): 661–666
- [67] Vossahl L B. 19-Diversity and expression of odorant receptors in *Drosophila*. *Insect Pheromone Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, **18**(5): 567–591
- [68] Munch D, Galizia C G. DoOR 20——comprehensive mapping of *Drosophila melanogaster* odorant responses. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 21841
- [69] Song H S, Lee S H, Oh E H, *et al.* Expression, solubilization and purification of a human olfactory receptor from *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 2009, **59**(3): 309–314
- [70] Fenz S F, Sachse R, Schmidt T, *et al.* Cell-free synthesis of membrane proteins: tailored cell models out of microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, **1838**(5): 1382–1388
- [71] Hein C, Henrich E, Orbán E, *et al.* Hydrophobic supplements in cell-free systems: Designing artificial environments for membrane proteins. *Engineering in Life Sciences*, 2014, **14**(4): 365–379
- [72] Proverbio D, Henrich E, Orbán E, *et al.* Membrane Protein Quality Control in Cell-Free Expression Systems: Tools, Strategies and Case Studies. 2014, 45–70
- [73] Sachse R, Dondapati S K, Fenz S F, *et al.* Membrane protein synthesis in cell-free systems: from bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Letters*, 2014, **588**(17): 2774–2781
- [74] Nakano H, Yamane T. Cell-free protein synthesis systems. *Biotechnology Advances*, 1998, **16**(2): 367–384
- [75] Nirenberg M, Caskey T, Marshall R, *et al.* The RNA code and protein synthesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1966, **31**(0): 11–24
- [76] Kim T W, Keum J W, Oh I S, *et al.* Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *Journal of Biotechnology*, 2006, **126**(4): 554–561
- [77] 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

- [78] Kim D M, Kigawa T, Choi C Y, *et al.* A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1996, **239**(3): 881–886
- [79] Endoh T, Kanai T, Sato Y T, *et al.* Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile. *Journal of Biotechnology*, 2006, **126**(2): 186–195
- [80] Nakano H, Matsuda K, Okumura R, *et al.* Accumulation of translational inhibitor during multi-hour cell-free protein synthesis reaction using rabbit reticulocyte lysate. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 1997, **83**(5): 470–473
- [81] Endo Y, Sawasaki T. High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system. *Biotechnology Advances*, 2003, **21**(8): 695–713
- [82] Schwarz D, Daley D, Beckhaus T, *et al.* Cell-free expression profiling of *E. coli* inner membrane proteins. *Proteomics*, 2010, **10**(9): 1762–1779
- [83] Zhang X, Sheng J, Huang L, *et al.* High-level soluble expression of one model olfactory receptor (ODR-10) in *Escherichia coli* cell-free system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, **30**(3): 893–901
- [84] Klammt C, Schwarz D, Fendler K, *et al.* Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *The FEBS Journal*, 2005, **272** (23): 6024–6038
- [85] Eshaghi S, Hedren M, Nasser M I, *et al.* An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. *Protein Science : a publication of the Protein Society*, 2005, **14**(3): 676–683
- [86] Kainosho M, Torizawa T, Iwashita Y, *et al.* Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. *Nature*, 2006, **440**(7080): 52–57
- [87] Sobhanifar S, Reckel S, Junge F, *et al.* Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 2010, **46**(1): 33–43
- [88] Sansuk K, Balog C I, Am V D D, *et al.* GPCR proteomics: mass spectrometric and functional analysis of histamine H1 receptor after baculovirus-driven and *in vitro* cell free expression. *Journal of Proteome Research*, 2008, **7**(2): 621–629
- [89] Elbaz Y, Steiner-Mordoch S, Danieli T, *et al.* *In vitro* synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (6): 1519–1524
- [90] Schwarz D, Junge F, Durst F, *et al.* Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nature Protocols*, 2007, **2**(11): 2945–2957
- [91] Xu Y, Lee J, Tran C, *et al.* Production of bispecific antibodies in "knobs-into-holes" using a cell-free expression system. *mAbs*, 2015, **7**(1): 231–242
- [92] Oza J P, Aerni H R, Pirman N L, *et al.* Robust production of recombinant phosphoproteins using cell-free protein synthesis. *Nature Communications*, 2015, **6**: 8168
- [93] Henrich E, Hein C, Dotsch V, *et al.* Membrane protein production in *Escherichia coli* cell-free lysates. *FEBS Letters*, 2015, **589**(15): 1713–1722
- [94] Sarraimegn V, Muller I, Milon A, *et al.* Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation: a challenge towards structure. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, **63**(10): 1149–1164
- [95] Corin K, Baaske P, Ravel D B, *et al.* A robust and rapid method of producing soluble, stable, and functional G-protein coupled receptors. *PLoS One*, 2011, **6**(10): e23036
- [96] Kaiser L, Graveland-Bikker J, Steuerwald D, *et al.* Efficient cell-free production of olfactory receptors: detergent optimization, structure, and ligand binding analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(41): 15726–15731
- [97] Tegler L T, Corin K, Hillger J, *et al.* Cell-free expression, purification, and ligand-binding analysis of *Drosophila melanogaster* olfactory receptors DmOR67a, DmOR85b and DmORCO. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 7867
- [98] Kanoi B N, Takashima E, Morita M, *et al.* Antibody profiles to wheat germ cell-free system synthesized plasmodium falciparum proteins correlate with protection from symptomatic malaria in Uganda. *Vaccine*, 2017, **35**(6): 873–881
- [99] Berrier C, Peyronnet R, Betton J M, *et al.* Channel characteristics of VDAC-3 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **459**(1): 24–28
- [100] Minkoff B B, Makino S I, Haruta M, *et al.* A Cell-free method for expressing and reconstituting membrane proteins enables functional characterization of the plant receptor-like protein kinase FERONIA. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(14): 5932–5942
- [101] Focke P J, Hein C, Hoffmann B, *et al.* Combining *in vitro* folding with cell-free protein synthesis for membrane protein expression. *Biochemistry*, 2016, **55**(30): 4212–4219
- [102] Henrich E, Peetz O, Hein C, *et al.* Analyzing native membrane protein assembly in nanodiscs by combined non-covalent mass spectrometry and synthetic biology. *eLife*, 2017, **6**: e20954
- [103] Matsubayashi H, Kuruma Y, Ueda T. Cell-free synthesis of SecYEG translocon as the fundamental protein transport machinery. *Origins of life and evolution of the biosphere: the Journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*, 2015, **44**(4): 331–334
- [104] Zieleniecki J L, Nagarajan Y, Waters S, *et al.* Cell-free synthesis of a functional membrane transporter into a tethered bilayer lipid membrane. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2016, **32**(10): 3594–3598
- [105] Yunker P J, Asahara H, Hung K C, *et al.* One-pot system for synthesis, assembly, and display of functional single-span membrane proteins on oil-water interfaces. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2016, **113**(3): 608
- [106] Fogeron M L, Jirasko V, Penzel S, *et al.* Cell-free expression, purification, and membrane reconstitution for NMR studies of the nonstructural protein 4B from hepatitis C virus. *J Biomol NMR*, 2016, **65**(2): 87–98

- [107]Pluhackova K, Gahbauer S, Kranz F, *et al.* Dynamic cholesterol-conditioned dimerization of the G protein coupled chemokine receptor Type 4. *PLoS Computational Biology*, 2016, **12** (11): e1005169
- [108]Krishnan M, Moolenaar G F, Gupta K, *et al.* Large-scale *in vitro* production, refolding and dimerization of PsbS in different microenvironments. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 15200
- [109]Liu X, Choudhury S, Roy R. *In vitro* and *in vivo* dimerization of human endonuclease III stimulates its activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(50): 50061–50069
- [110]Oates J, Hicks M, Dafforn T R, *et al.* *In vitro* dimerization of the bovine papillomavirus E5 protein transmembrane domain. *Biochemistry*, 2008, **47**(34): 8985–8992
- [111]Carraher C, Nazmi A R, Newcomb R D, *et al.* Recombinant expression, detergent solubilisation and purification of insect odorant receptor subunits. *Protein Expression and Purification*, 2013, **90**(2): 160–169

Membrane Protein Expression: Functional Expression, Folding and Assembly Within Cell Free System

LI Jian-Yong, MAN Ya-Hui, CHEN Qian, PEI Di, WU Wen-Jian*

(Department of Chemistry and Biology, National University of Defense Technology, Changsha 410000, China)

Abstract Membrane proteins (MPs) play a crucial role in the life activities of humans and other species, which account for about 30% in all sequenced genomes. Drug targeting sites, cell-to-cell signaling, and detection of the environment mainly depends on specific membrane receptor proteins. MPs have significant theoretical and practical value in industrial, environmental, national defense and other research areas. Olfactory receptor (OR) protein is one kind of typical MPs, belonging to G protein-coupled receptor (GPCR) family. ORs regulate the organism to hunt for food, escape from risks and search for spouses. ORs are mainly distributed in the vertebrate nasal cavity or insect antennae. A series of reactions will be stimulated when the odorants bind with osmoceptors. The stimulus signal will be converted into an electrical signal. Eventually pass to the nervous system and to make the appropriate instructions. It is tough to extract MPs directly from tissues. Heterologous expression of MPs makes it difficult to integrate proteins into membranes, which brings great challenges to the study of structure and function. Cell-free protein synthesis system(CFPS) is an efficient strategy to express proteins *in vitro* on account of the open system and independence of cell lives. CFPS puts forward new ideas for synthesis and assemblage of MPs. It will be a major breakthrough for the study of structures and functions of MPs when the self-assembly and dimer formation can be accomplished *in vitro*. Here, we summarize latest progress in using CFPS to express ORs and other MPs.

Key words membrane protein, cell-free protein synthesis system, olfactory receptor, biosensor, signal transduction

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0372

*Corresponding author.

Tel: 86-731-84574247, E-mail: wjwu67@126.com

Received: October 17, 2017 Accepted: January 9, 2018