

无细胞蛋白表达系统新进展及在生物制药工程中的应用

盛嘉元, 张绪, 郑强, 徐志南

浙江大学化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027

盛嘉元, 张绪, 郑强, 等. 无细胞蛋白表达系统新进展及在生物制药工程中的应用. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1491-1503.

Sheng JY, Zhang X, Zheng Q, et al. Cell-free protein synthetic system: progress and applications in biopharmaceutical engineering. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1491-1503.

摘要: 无细胞蛋白表达体系是一种以细胞抽提物为基础的体外合成蛋白质表达技术, 具有遗传背景简单、反应操控简便等特点, 已成为研究生物反应系统的重要技术手段。在研究人员的不断努力下, 反应体系从原核扩展到真核蛋白质合成体系, 而且目标蛋白表达量从毫克级提高到数克级每升, 成本不断降低, 反应规模可达到百公升级。近年来, 无细胞蛋白表达系统在复杂蛋白、毒性蛋白和膜蛋白表达方面的优势逐渐体现, 展示了其在生物制药领域的重要应用潜力。总之, 无细胞技术已经成为异源蛋白质高效合成和生物制药领域中有巨大潜力的新策略。

关键词: 无细胞蛋白表达系统, 进展, 生物制药

Cell-free protein synthetic system: progress and applications in biopharmaceutical engineering

Jiayuan Sheng, Xu Zhang, Qiang Zheng, and Zhinan Xu

Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China

Abstract: Cell-free protein synthesis (CFPS) systems based on crude cell extracts have been used in protein expression in vitro. With the researchers' endeavor for decades, the CFPS system has been developed as an important research tool in many frontiers

Received: December 26, 2013; **Accepted:** April 3, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 20736008, 21306164, 21276226).

Corresponding author: Zhinan Xu. Tel: +86-571-87951220; E-mail: znxu@zju.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20736008, 21306164, 21276226) 资助。

网络出版时间: 2014-05-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130665.html>

of fundamental and applied biology because of its clear genetic background and simplicity to control the reaction. The yield of CFPS systems derived from prokaryote or eukaryote has increased to several grams per liter with constantly decreasing cost. Nowadays grams of protein could be prepared using a large-scale cell-free system. Recently, the advantages on the expression of complicated, toxic and membrane proteins have shown the great potential of the CFPS systems. The rapid progress of this technology made us to believe that it will take an important place in biopharmaceutical industries undoubtedly.

Keywords: cell-free protein synthetic system, progress, biopharmaceutical engineering

无细胞蛋白合成体系作为一种快速、高效的体外合成蛋白手段,通过在细胞抽提物的酶系中补充转录与翻译所需各类底物和能量物质从而完成目标蛋白的合成。与传统基于活细胞的体内表达系统相比,无细胞蛋白合成体系具有多种优点,如无膜阻隔、基因和聚合酶浓度可控性、报告物易量化测量、能直接以 PCR 产物为模板,以及具有高通量性等等。自从 Nirenberg 和 Matthaei 1961 年利用无细胞系统发现了密码子以来^[1],无细胞蛋白表达系统快速高效合成具有生物活性蛋白的特质驱使其不断发展,已成为生物科学基础研究及应用研究中的重要工具^[2-3]。近年来各种常规胞内手段难以表达的蛋白得以在体外无细胞中顺利表达^[4-6],并发掘其高通量应用潜力建立起多种蛋白质文库^[7]用于蛋白进化^[8]和结构基因组学方面的研究^[9]。早期无细胞系统存在多种缺点,如反应持续时间短,产率低,必须补充价格昂贵的能量物质与底物,反应体系体积小等。而且,反应体系内部一直如黑匣子一般没有得到充分研究^[2,10]。近十年来这些问题逐步得到解决,已经构建成功反应体积达 100 L 的无细胞蛋白表达体系,标志着其逐渐开始展现工业化应用前景^[11]。

目前重组蛋白药物已经在全球药物市场上占有非常重要的地位。在 2007 年 6 000 亿美元的制药产业中占有 1/6 的份额,每年还以 7%–15% 的速度在增长^[12]。通常天然蛋白可能会

由于水溶性差,易被蛋白酶降解,半衰期短,化学稳定性差等各种因素导致只有极少一部分能直接应用于医疗目的。能够稳定地表达和纯化出达到药用指标的重组蛋白是生物制药业的主要目标。重组蛋白药物的生物学功能与其肽链折叠与修饰方式高度相关,这决定了重组蛋白药物远高于小分子化学药的研发难度。因此,在生物前制药工业中不仅需要继续完善已有的大肠杆菌、酵母和 CHO 等表达系统,也必须发展更为灵活高效的重组蛋白质生产新技术。此外,人类基因组序列及生物信息学数据表明,人类还有成千上万的蛋白质功能结构未被了解,其中相当一部分具有医疗方面的潜力。在研发人类治疗蛋白过程中需要制备大量高质量的蛋白,用于蛋白结构、功能和药效学等研究,而常规体内表达系统难以满足这一不断增长需求。无细胞蛋白表达系统高效快捷和高通量特性可以为这些制约生物制药业发展的关键问题提供新的解决方法。

本文结合已经开展的无细胞合成多种蛋白质的研究成果,总结无细胞蛋白表达体系的最新研究进展,对该系统在生物制药科学前沿领域发展方向上的应用潜力进行了重点讨论。

1 无细胞蛋白表达体系研究进展

从事无细胞蛋白表达研究或以之作为工具的研究人员都会面临无细胞蛋白表达系统的种

类选择, 表达条件优化, 蛋白功能构象, 以及表达规模一系列问题。本文总结了近年来无细胞蛋白表达体系的进展, 为后续研究工作开展提供参考。

1.1 不同物种无细胞体系的比较

一个完整的无细胞蛋白表达系统必须包含转录、翻译、蛋白折叠和能量代谢模块 (例如: 核糖体、氨酰-tRNA 合成酶、翻译起始、延伸因子、核糖体释放因子、分子伴侣等)。细胞抽提物在底物供应充足的条件下如一个小型细胞工厂生产并折叠蛋白质, 直至底物耗尽 (如 ATP、半胱氨酸等) 或副产物 (如无机磷 P_i) 积累到一定浓度抑制反应继续进行。理论上所有来源于微生物、植物或动物细胞的抽提物, 都能满足蛋白表达的基本需求, 具有构建无细胞蛋白表达系统的潜力。但是不同物种来源的无细胞系统的表现差异巨大。因此对象的选择成为构建系统的首要考虑因素。

我们除了考虑物种对象, 还必须考虑原料的供应、制备过程的难易程度、蛋白产量、蛋白的复杂度、下游处理简易程度和成本高低等问题。到目前为止已经商业化的无细胞蛋白表达系统有大肠杆菌系统 (*E. coli* extract, ECE)、

兔网织红细胞 (Rabbit reticulocyte lysate, RRL)、麦胚 (Wheat germ extract, WGE)、昆虫 (Insect cell extract, ICE) 和人源系统。除此以外还有链霉菌 *Streptomycetaceae*^[13]、利什曼锥虫 *Leishmania tarentolae*^[14]、爪蟾卵母细胞 *Xenopus laevis*^[15]、拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[16] 等系统报道构建成功。表 1 中对常见的商业化系统作了比较。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受欢迎和普遍使用的系统。并在其基础上构建了只包含最基本转录翻译功能的 PURE 系统, 大大降低了研究的遗传背景^[17]。

相对于原核系统, 大多数种类真核细胞的培养难度大, 花费更高, 其细胞抽提物的制备过程更为繁琐, 但是它们具有一些可以表达复杂蛋白以及实现翻译后修饰等优势^[18]。真核系统中 WGE、RRL 和 ICE 系统最为常见。WGE 是用小麦胚芽制备而成^[19-20], 在真核系统中产量最高, 但是其仍旧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^[21-22]、乙酰基化^[23-24]、磷酸化^[25]、信号肽处理^[26]和核糖基化等翻译后修饰手段。RRL 系统在进行翻译后修饰时需要额外添加分离纯化的微体

表 1 无细胞蛋白表达系统比较

Table 1 Comparison of various cell-free protein synthesis systems

Type	Cell cultivation	Preparation	Cost	Yield	Large protein	Post-translational modifications
<i>E. coli</i> extract	Easy	Simple	Low	High	No	No
Wheat-germ extract	Easy	Lengthy and complex	Low	High	Yes	No
Rabbit reticulocyte lysate	Difficult	Easy and quick	High	Low	Yes	Yes
Insect cell lysate	Difficult	Easy and quick	High	Low	Yes	Yes
Human cell lysate	Difficult	Easy and quick	High	Low	Yes	Yes

(Microsome), 其蛋白产量只有数十微克/毫升^[27-28]。ICE 系统通常用草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 细胞制备,产量也为数十微克/毫升蛋白^[29-30]。除了以上常见无细胞系统,酵母系统、癌细胞、杂交瘤细胞也见诸报道。Zárate 等在 2010 年尝试将原核系统的高表达量的优势与真核系统折叠效率高的优势结合在一起,构建了一种新型的大肠杆菌与麦胚的杂合无细胞系统^[31],能够在较高蛋白表达基础上实现蛋白质的翻译后修饰。各种无细胞体系的出现使得研究人员可以较为灵活地根据不同的实验目标选择合适的无细胞表达系统。

1.2 无细胞蛋白表达技术关键突破

无细胞蛋白表达技术的进步主要归结于 3 方面的突破:合适的底物供应、平衡稳定的反应环境、抑制性副产物的去除。不难发现所有这些突破点都与一个处于快速生长期的细胞所拥有的特点高度一致^[32-33]。

Kim 和 Swartz 通过一系列研究表明在无细胞体系中并不是只有磷酸化反应为蛋白合成提供能量(图 1A, B),抽提物中依然有代谢网络影响整个表达过程^[34-36]。无细胞体系不再是一个“黑匣子”,其中的代谢途径得以了解(图 1C)。他们的工作使得无细胞系统的构建工作有新的

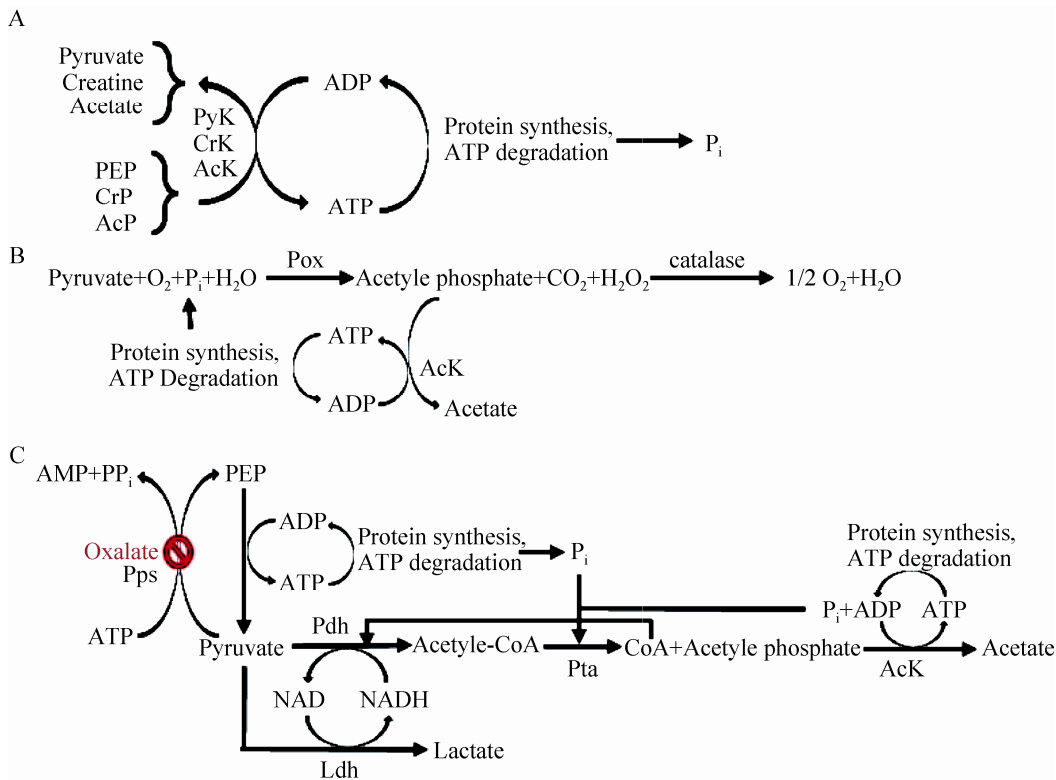


图 1 无细胞系统中能量供应方式 (A: 以高能磷酸化合物直接供能; B: 氧化磷酸化途径供能; C: 利用中心代谢网络供能)^[40]

Fig. 1 Energy supplement of the cell-free protein expression system^[40]. (A) Costly one-step phosphorylation reactions driven by PEP, CP or AcP. (B) Energy supply through oxidative phosphorylation. (C) Energy supply through activated central metabolism.

思路, 研究人员认识到细胞质环境的模拟对于高效的体外表达系统至关重要。最近几年来, 通过对细胞抽提物制备方法的改进, 使得抽提物更加稳定, 并充分利用其本身代谢网络来为无细胞系统提供能量。Tarui 等通过激活中心代谢网络与利用氧化磷酸化途径, 制备的无细胞体系在 2 h 内蛋白表达量可达到 1.2 mg/mL^[30]。Calhoun 和 Swartz 等证明添加葡萄糖也能够为无细胞蛋白表达系统提供能量, 并用单磷酸核苷替代体系中的三磷酸核苷, 大幅降低了无细胞的制备成本^[37-40]。Wang 等利用麦芽糖糊精、可溶性淀粉、糖原等代谢较为缓慢的物质作为能源底物, 大大稳定了反应体系的 pH 环境和无机磷的浓度^[41]。最近 Caschera 在无细胞体系中添加麦芽糖, 使其体系能够重新利用无机磷, 减少副产物对反应的抑制作用, 成功将批次反应的时间延长到 10 h, 目标蛋白产量高达 2.3 mg/mL^[42]。此外, 通过敲除导致氨基酸降解的酶也能够进一步提高蛋白合成的效率^[43]。

最初 Nirenberg 等用于蛋白预测性研究的无细胞反应属于批次式 (Batch) 无细胞反应^[1]。在这种反应模式下, 维持无细胞反应正常进行的底物与能量物质在反应中消耗迅速而得不到补充, 因而反应持续时间很短, 蛋白产率往往只有数 $\mu\text{g/mL}$, 严重阻碍了无细胞蛋白表达技术的应用与推广。为了克服批次式反应模式的缺点, Spirin 等在 1988 年提出了一种更高效的无细胞反应模式: 连续交换式无细胞反应 (Continuous exchange cell-free, CECF)^[44]。CECF 的反应体系由负责表达目标蛋白的反应模块 (Reaction buffer) 与负责为无细胞反应补充消耗的能量和底物补充模块 (Feeding buffer) 组成。反应模块与补充模块之间由一层具有选择透

性的半透膜分隔开。通过分子扩散作用 (浓度差), 补充模块中的高浓度的能量和底物小分子透过半透膜进入反应模块, 源源不断地为无细胞反应提供能量与底物, 维持反应体系的正常运行; 另一方面, 反应模块中堆积的无机磷等小分子副产物也能够透过半透膜扩散到补充模块, 从而降低了副产物对无细胞反应的抑制作用, 保证了反应的顺利进行, 表达的目标蛋白在反应模块中不断积累。采用高效的 CECF 体系, 表达水平一般可以达到 3-6 mg/mL。

虽然 CECF 系统可以提高单位体积内的蛋白表达量, 但是其反应需要约十倍于反应体积的含有氨基酸、NTP 等物质的补充溶液, 反应时间长达 10 h 以上。因此, 该模式较低的单位时间产率以及高昂的单位产量成本, 并不是常规无细胞表达手段的首选方式, 仅在进行蛋白结晶、蛋白结构测定等研究领域选择 CECF 模式进行目标蛋白的高浓度表达。目前报道研究大多集中在采用葡萄糖、麦芽糖等廉价能源物质来稳定反应体系的化学环境, 尽可能回收利用无机磷, 不断提高 Batch 模式的反应效率。

在这些基础上, Sutro 生物制药公司构建了经济的 *E. coli* 大体积无细胞系统, 在 100 L 的反应体积下, 10 h 之内得到了 700 mg/L 的重组人细胞因子 (rhGM-CSF)^[11]。该结果为今后利用无细胞蛋白表达系统来商业化生产对细胞有毒性的蛋白以及其他难以表达的蛋白奠定了基础。

1.3 无细胞体外表达蛋白的折叠

蛋白要行使功能就需要有正确的构象, 体外表达含有二硫键等复杂结构的蛋白数十年来都一直是研究焦点。蛋白的正确折叠需要将目标蛋白的各个疏水区域进行保护使其互不影响, 提供合适的化学环境, 还需要加入铁硫簇

等辅助因子来帮助二硫键的形成以及促进二硫键的异构化。长期的自然进化使得生物在细胞内不同区域来分别进行蛋白合成与氧化折叠,而无细胞体系需要在同一反应空间中同时完成两项任务。Swartz 课题组首先用碘乙酰胺(Iodoacetamide, IAM)处理细胞抽提物,然后用谷胱甘肽缓冲液来提供氧化环境,再利用 DsbC 来催化二硫键的形成,以此模拟体内的氧化折叠途径成功合成了有活性的尿激酶以及组织纤溶酶原激活物片段^[45-46]。

生物体内还有分子伴侣这一类蛋白因子来帮助新生多肽链保持正确的构象,避免蛋白聚集影响其生物活性。Katzen 等在无细胞体系中直接加入分子伴侣就成功表达了复杂蛋白^[47]。除了简单地直接加入分子伴侣, Welsh 等还通过将真核来源的 Hsp70 分子伴侣 BiP 与触发因子(一类核糖体相关的 *E. coli* 分子伴侣)共表达来模拟细胞内膜上分子伴侣协助的蛋白折叠过程^[48],这一方法提高了分泌性真核蛋白的可溶性表达。Sasaki 通过加入两性多糖纳米凝胶在无细胞体系中来帮助蛋白折叠,该凝胶可以结合并控制多肽链的释放从而避免了蛋白过快表达导致的聚集沉淀和错误折叠^[49]。影响蛋白折叠的因素非常广泛,在无细胞中帮助蛋白的正确折叠的本质手段就是要尽量模拟蛋白在胞内表达的真实环境。目前并没有一种手段可以解决所有问题,需要根据目标产物的特点,采取相应的调控反应环境方法,帮助蛋白质在无细胞中正确折叠,提高生物活性。

2 无细胞蛋白表达系统在生物制药中的应用

国际药物研发中,新药研发难度越来越大,

原研生物药研发数量下降明显。近 10 年再未出现对市场有较大影响的全新产品类别,解决这些问题需要在人类基因组上有进一步突破。在越来越难的原研生物药研发中,单抗和疫苗占据研发主体,重组蛋白研发比例较低且更多关注产品的改性升级。无细胞蛋白表达技术在生物制药业上游研发与下游药物生产两方面遇到瓶颈时都显示出很大的发展应用潜力。

2.1 在蛋白表达时加入非天然氨基酸

蛋白进行工程改性的重要手段之一是在蛋白序列中引入非天然氨基酸来提供额外的基团以便对蛋白质进行化学修饰。Cho 等将非天然的 p-乙酰苯丙氨酸(pAcF)引入人生长因子(hGH)中的特定位点,使其可以和聚乙二醇实现共价结合^[50]。同样将 β 干扰素中蛋氨酸替换成非天然类似物并对其特定位点进行 PEG 修饰,得到的产物在治疗多发性硬化症时给药方式更加简便,显示出极高的耐受性。Zimmerman 等从詹氏甲烷球菌 *Methanococcus jannaschii* 中找到一种高 pAMF(非天然酪氨酸)亲和性的酪氨酰-tRNA 合成酶从而实现将其插入到曲妥珠单抗(Trastuzumab)的指定位置。通过点击化学的方法将 DBCO-PEG-MMAF(DBCO-PEG-monomethyl auristatin)在 pAMF 处与单抗结合到一起,形成了新型的靶向抗肿瘤药物^[51]。目前全新领域的重组蛋白药物研发越来越难,目前的重磅药物基本都是基于蛋白药物升级,基本要经历蛋白修饰(速效、长效、给药方式升级)这一过程,而无细胞技术可以便捷可控地添加各种非天然氨基酸实现常规重组表达后难以解决的复杂修饰过程,日益显示出在这方面的优势^[52]。

2.2 类病毒颗粒的表达

类病毒颗粒(Virus-like particles, VLPs)是

一类大小在 25–100 nm,由一种或多种结构蛋白自组装成的复合体。由于其结构上类似于病毒颗粒,能引起免疫应答,但是 VLPs 不含有遗传物质,不能自我复制,可以成为一种安全的疫苗^[53]。病毒的衣壳蛋白通常拥有天然的自组装能力,能够在原核系统或真核系统中组装为一种空心结构,在药物传递以及作为基因治疗方面引起研究人员的关注。要成功组装成为 VLPs 有严格的条件,首先其亚组成单位结构要高度一致;其次,其亚基比例要合适,纯度要求高。胞内系统由于难以大量产生结构高度一致的亚基蛋白,以及纯度低等限制性因素,因此直接合成亚病毒颗粒非常困难,而体外无细胞系统可以克服上述限制性因素。Bundy 等利用无细胞系统成功表达了 MS2 外壳蛋白^[54]。无细胞自身的一些特点更可以大大扩展 VLPs 的应用范围。比如 Patel 和 Swartz 在表达类病毒颗粒时掺入非天然氨基酸,表达的 VLPs 可以用抗体片段、GM-CFS、DNA 和聚乙二醇来进行修饰^[55]。事实表明,这些 VLPs 根据其掺入非天然氨基酸的比例和位点,可以同时用多种手段对其进行修饰来提高 VLPs 的性能。Bundy 和 Swartz 还通过控制无细胞系统的氧化还原环境,调节衣壳蛋白单聚体的二硫键的表达从而提高了 VLPs 的稳定性^[56]。这些研究不断证明无细胞蛋白表达系统在利用 VLPs 进行药物传递和疫苗开发上有很高的应用价值和潜力。

2.3 药物靶标膜蛋白表达

哺乳动物基因组 30%都由膜蛋白组成,其中大概有一半都可以成为药物靶标。因此需要对这些膜蛋白的结构功能进行深入研究。目前膜蛋白的表达主要有以下障碍:首先,细菌的细胞磷脂膜组成结构并不适于哺乳动物膜蛋白正确插入和折叠;其次,膜蛋白的体内过量表

达也会造成生物毒性和聚集沉淀;另外从哺乳动物细胞分离纯化膜蛋白并整合进入人工脂质体也面临非常大的挑战。这些原因造成膜蛋白的重组表达和纯化非常困难。无细胞体系为膜蛋白的表达纯化提供了高效平台,在开放性的体外表达体系中可以直接加入去污剂以及脂质体,蛋白表达后可以直接整合进脂质体或直接处于疏水环境中有效避免聚集,为后续分离纯化和功能研究提供了很大便利。无细胞体系表达功能性膜蛋白主要有 3 种模式(图 2)。

P-CF (Precipitate cell-free) 模式:在标准无细胞反应体系,大多数膜蛋白以沉淀的形式表达,这种沉淀可以用一些温和的去垢剂重悬,得到膜蛋白-去垢剂胶束溶液。但由于去垢剂结构的差异,不同去垢剂对膜蛋白的重悬效率是明显不同的。该策略的主要优点就是用简单的流程即可得到较高纯度的可溶膜蛋白。

D-CF (Detergent-based cell-free) 模式:直接在无细胞体系添加去垢剂,其形成的胶束提供膜蛋白正确折叠所需要的疏水环境,实现目标蛋白的体外可溶表达。无细胞体系表达膜蛋白常用去垢剂有烷基糖苷(如 β -OG、DDM)、类固醇衍生物(如 Digitonin)、聚氧乙烯烷基醚(如 Brij35、Brij58、Brij78、Brij98、Tween20、Tween80)、聚氧乙烯衍生物(如 Triton X-100)、长链磷脂酸甘油(如 LMPG、LPPG)以及单链/双链磷脂酸胆碱(如 DHPC、DPC)等。虽然去垢剂已成功应用于多种膜蛋白的功能性表达,但由于膜蛋白、去垢剂之间结构的差异,不同膜蛋白所需要的去垢剂种类和浓度是不相同的。目前尚未发现对各种膜蛋白都普遍适用的去垢剂。而且去垢剂的添加并不能够保证蛋白质的正确折叠,所以用该策略制备得到的膜蛋白只有很少一部分的功能是得到表征。

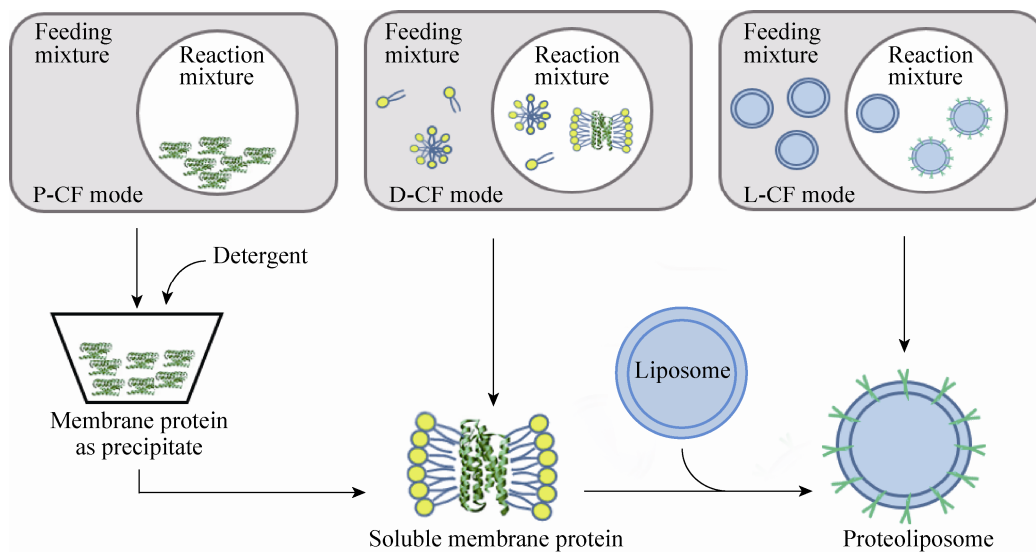


图 2 无细胞膜蛋白表达模式 (P-CF 模式: 无疏水环境, 膜蛋白以沉淀形式表达; D-CF 模式: 有去污剂提供疏水环境, 蛋白以可溶形式表达; L-CF 模式: 膜蛋白表达后直接整合到脂质体中)

Fig. 2 Expression mode of CF production of membrane proteins. P-CF mode: no hydrophobic environments are provided, and the MPs precipitate after translation. D-CF mode: the synthesized MPs can stay soluble by insertion into the provided detergent micelles. L-CF mode: the synthesized MPs have the possibility to integrate into supplemented liposomes.

L-CF (Lipid-based cell-free) 模式: 由膜蛋白能够自动定位于细胞膜的特点, 直接在无细胞反应体系添加磷脂双分子层小球 (脂质体), 同时实现膜蛋白合成、膜定位和稳定构象, 可以提高功能性膜蛋白质的表达效率。通过蔗糖梯度离心或亲和层析纯化即得到嵌有目的蛋白的脂质体 (Proteoliposome), 可直接用于膜蛋白的功能重建检测。

目前已有一大批膜蛋白在无细胞中得以成功表达。G 蛋白偶联受体是一类非常重要的膜蛋白药物靶标, 在 *E. coli* 体内过量表达通常以包涵体的形式存在, 在哺乳动物体内则表达量非常低。Ishihara 等在 *E. coli* S30 系统中成功表达了人 β_2 肾上腺素受体 (β_2AR), 人 M2 毒蕈碱乙酰胆碱受体 (M2) 以及鼠神经降压素受体

(NTR), 表达量在 150–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间^[57]。Klammt 等在 CECF 系统中表达猪 2 型加压素受体 (V2R) 表达量高达 3 mg/mL ^[58], 在大肠杆菌无细胞体系中以沉淀形式高效表达了大肠杆菌多药转运蛋白 EmrE、SugE、TehA 和 YfiK^[59]。Goren 等在麦胚系统中以 L-CF 模式表达硬脂酰 CoA 脱饱和酶时发现 90% 以上的蛋白成功整合到脂质体中, 当脱饱和酶与细胞色素 B5 共表达时, 两者可以同时整合到脂质体中^[60]。这些结果都显示出无细胞体系表达膜蛋白对传统表达方式的劣势。

本实验室利用无细胞表达系统成功表达出水通道蛋白 AqpZ^[61-63], 表达量高达 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在 CECF 体系中成功表达 Aqp4 并成功证明其功能^[64]。利用大肠杆菌无细胞表达系统表达日本

血吸虫 *Schistosoma japonicum* 的腺苷转运蛋白 (sjANT) 时表达量高达 472 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 是之前报道最高表达量的 25 倍之多^[65]。在无细胞体系中高效表达这些受体膜蛋白可以解决制约药物受体研究中的瓶颈问题, 研究工作者可以短时间内就得到大量高纯度蛋白进行结构分析, 或者高通量药物筛选工作。

2.4 高通量无细胞技术

在后基因组时代, 高通量蛋白表达技术显得越来越重要。而无细胞蛋白表达系统其自身的许多特点使其非常利于构建高通量系统。首先, 该系统可以直接使用 PCR 片段为模板, 从而避免多步繁琐的基因克隆步骤; 其次, 已经开发出来非常适合微量蛋白表达的高效系统 (如在 96 或 384 孔板); 第三, 有巨大的潜力利用微芯片技术实现自动化操作; 最后, 由于反应体系没有膜结构的存在, 反应时可以随时进行外界干预, 如添加同位素标记的氨基酸等等。

Goshima 等用 WGE 系统合成了 13 364 个人源蛋白, 大多数蛋白被证明具有生物活性, 99.86% 的蛋白成功转印到玻璃基片上构建了蛋白微阵列芯片^[7]。Yamamoto 等设计了更为精密、复杂的可控温的微流控无细胞反应器^[66]。这一基于 PCR 模板直接表达蛋白的技术省去了繁琐的 DNA 克隆、蛋白纯化步骤, 结合机器人技术使得蛋白芯片制作分析过程可以节省更多人力物力并进一步提高分析的可控性与精确性。

除芯片或蛋白阵列以外, 另外一种利用微囊或脂质体包裹的无细胞体系构建人工细胞方式的微体系也得到了很多发展, Shima 等以蛋黄磷脂酰胆碱、胆固醇以及聚乙二醇为原料制备脂质体在其中包裹的无细胞体系成功表达了绿

色荧光蛋白^[67]。这些微囊体均匀分布在补充溶液中可以看成微型 CECF 系统, 脂质体的磷脂双分子层可以看作半透膜, 可以像细胞一样在内部合成蛋白, 内外物质得以交换。但是由于磷脂双分子层缺乏细胞膜上的离子通道和转运蛋白, 内外物质的交换效率很低, 因此在基于脂质体的无细胞反应时共表达一些离子通道来增强磷脂双分子层内外的物质交换, 该方法可以构建更接近于真实的人工细胞。这种基于微囊或脂质体的高通量体系非常适合于利用流式细胞仪进行快速筛选。

这些高通量技术给研究人员提供了很好的研究平台, 不仅可以利用高通量无细胞技术制作蛋白组学芯片研究其相互作用及功能, 还可以在脂质体中直接表达嵌入膜中有生物活性的药物靶标蛋白, 构建药物的快速筛选模型。这些高通量无细胞技术为解决生物制药业长期面临的蛋白功能性高效表达及药物筛选方面关键问题提供了新的方法与思路。

3 总结与展望

体外生物系统作为体内生物系统的补充, 许多难以在体内进行研究的问题在其中得以解决。随着体外系统构建技术的不断成熟, 成本不断降低, 其主要研究范畴也从最初的生命基础研究开始向合成生物学和生物制药领域拓展, 并初步展现出其工业应用价值。

目前, 无细胞系统仍有急需解决的问题: 首先, 以大肠杆菌为代表的原核无细胞系统技术上较为成熟, 产量和成本都得到了较好的控制。但是其在医药工业中的应用仍然受限于糖基化等翻译后修饰手段的缺失。而许多高价值

的生物类药物都是糖蛋白,基于 CHO 等哺乳动物细胞的无细胞体系表达量依然很低,远远达不到产业化需求。其研究成本不仅受限于昂贵的细胞培养过程,而且真核体系的内部调控等机制也远远比原核生物复杂。因此发展高效廉价的符合制药行业规范的 CHO 等无细胞系统才能真正突破其在生物制药业上的瓶颈问题^[68]。其次,无细胞蛋白表达大多数情况下仍旧着力于单个基因的表达研究,在无细胞系统中实现多基因的功能性表达可以在低遗传背景条件下研究一系列相关蛋白的相互作用、构建代谢途径和构建多药物靶点共筛选模型^[69],将大大拓展无细胞技术的研究范畴。

总而言之,以低廉的成本,在反应体系中高效整合进所需的生物代谢途径及网络才能解决体外生物学最根本的问题:弥补体外生物系统与体内生物系统在功能复杂度上的鸿沟。这些令人望而却步的问题一旦得以解决,研究人员将根本性地掌控整个反应体系,充分挖掘无细胞体外合成系统的潜力,更快更好地得到其想要的产品。

REFERENCES

- [1] Nirenberg MW and Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1961, 47(10): 1588–1602.
- [2] Swartz JR. Developing cell-free biology for industrial applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(7): 476–485.
- [3] Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(3): 150–156.
- [4] Goerke AR, Swartz JR. Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(2): 351–367.
- [5] Kanter G, Yang J, Voloshin A, et al. Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood*, 2007, 109(8): 3393–3399.
- [6] Yang J, Kanter G, Voloshin A, et al. Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(5): 503–511.
- [7] Goshima N, Kawamura Y, Fukumoto A, et al. Human protein factory for converting the transcriptome into an *in vitro*-expressed proteome. *Nat Methods*, 2008, 5(12): 1011–1017.
- [8] Griffiths AD, Tawfik DS. Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization. *EMBO J*, 2003, 22(1): 24–35.
- [9] Endo Y, Sawasaki T. Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17(4): 373–380.
- [10] Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1185–1194.
- [11] Zawada JF, Yin G, Steiner AR, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(7): 1570–1578.
- [12] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 917–924.
- [13] Lee KY, Kwon YC, Lee KH, et al. A cell-free protein synthesis system derived from the extract of *Streptomyces venezuelae*. *J Biotechnol*, 2010, 150: 528.
- [14] Kovtun O, Mureev S, Jung W, et al. *Leishmania* cell-free protein expression system. *Methods*, 2011, 55(1): 58–64.
- [15] Pratt CA, Mowry KL. Preparation of a highly active cell-free translation system from immature *Xenopus laevis* oocytes. *Methods*, 2010, 51(1): 101–105.
- [16] Murota K, Hagiwara-Komoda Y, Komoda K, et al.

- Arabidopsis cell-free extract, ACE, a new *in vitro* translation system derived from *Arabidopsis callus* cultures. *Plant Cell Physiol*, 2012, 52(8): 1443–1453.
- [17] Ohashi H, Kanamori T, Shimizu Y, et al. A highly controllable reconstituted cell-free system—a breakthrough in protein synthesis research. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11(3): 267–271.
- [18] Chang HC, Kaiser CM, Hartl FU, et al. *De novo* folding of GFP fusion proteins: high efficiency in eukaryotes but not in bacteria. *J Mol Biol*, 2005, 353(2): 397–409.
- [19] Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 559–564.
- [20] Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nat Protoc*, 2010, 5: 227–238.
- [21] Hancock JF. Reticulocyte lysate assay for *in vitro* translation and posttranslational modification of Ras proteins. *Methods Enzymol*, 1995, 255: 60–65.
- [22] Suzuki T, Ito M, Ezure T, et al. Protein prenylation in an insect cell-free protein synthesis system and identification of products by mass spectrometry. *Proteomics*, 2007, 7(12): 1942–1950.
- [23] Gibbs PEM, Zouzias DC, Freedberg IM. Differential post-translational modification of human type-I deratins synthesized in a rabbit reticulocyte cell-free system. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 824(3): 247–255.
- [24] Suzuki T, Ito M, Ezure 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): 4486–4495.
- [25] Safer B, Jagus R. Control of eIF-2 phosphatase activity in rabbit reticulocyte lysate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1094–1098.
- [26] Suzuki T, Ezure T, Ando E, et al. Preparation of ubiquitin-conjugated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol*, 2010, 145(1): 73–78.
- [27] Jackson RJ, Hunt T. Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods Enzymol*, 1983, 96: 50–74.
- [28] Shields D, Blobel G. Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes. *J Biol Chem*, 1978, 253(11): 3753–3756.
- [29] Ezure T, Suzuki T, Shikata M, et al. A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Methods Mol Biol*, 2010, 607: 31–42.
- [30] Tarui H, Murata M, Tani I, et al. Establishment and characterization of cell-free translation/ glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(4): 446–453.
- [31] Zárata X, Henderson DC, Phillips KC, et al. Development of high-yield autofluorescent protein microarrays using hybrid cell-free expression with combined *Escherichia coli* S30 and wheat germ extracts. *Proteome Sci*, 2010, 8: 32.
- [32] Jewett MC, Swartz JR. Mimicking the *Escherichia coli* cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 86(1): 19–26.
- [33] Jewett MC, Calhoun KA, Voloshin A, et al. An integrated cell-free metabolic platform for protein production and synthetic biology. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 220.
- [34] Kim DM, Swartz JR. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 66(3): 180–188.
- [35] Kim DM, Swartz JR. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(3): 385–390.
- [36] Kim DM, Swartz JR. Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74(4): 309–316.
- [37] Calhoun KA, Swartz JR. An economical method

- for cell-free protein synthesis using glucose and nucleoside monophosphates. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(4): 1146–1153.
- [38] Calhoun KA, Swartz JR. Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90: 606–613.
- [39] Calhoun KA, Swartz JR. Total amino acid stabilization during cell-free protein synthesis reactions. *J Biotechnol*, 2006, 123(2): 193–203.
- [40] Calhoun KA. Analysis and control of central metabolic pathways during cell-free protein synthesis reactions[D]. Stanford: Stanford University, 2006.
- [41] Wang Y, Zhang YHP. Cell-free protein synthesis energized by slowly-metabolized maltodextrin. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 58.
- [42] Caschera F, Noireaux V. Synthesis of 2.3 mg/mL of protein with an all *Escherichia coli* cell-free transcription-translation system. *Biochimie*, 2014, 99: 162–168.
- [43] Michel-Reydellet N, Calhoun K, Swartz J. Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome. *Metab Eng*, 2004, 6(3): 197–203.
- [44] Kim DM, Swartz JR. Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 85: 122–129.
- [45] Yin G, Swartz JR. Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 86(2): 188–195.
- [46] Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(3): 150–156.
- [47] Welsh JP, Bonomo J, Swartz JR. Localization of BiP to translating ribosomes increases soluble accumulation of secreted eukaryotic proteins in an *Escherichia coli* cell-free system. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(8): 1739–1748.
- [48] Zawada JF, Yin G, Steiner AR, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production - a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(7): 1570–1578.
- [49] Cho H, Daniel T, Buechler YJ, et al. Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(22): 9060–9065.
- [50] Zimmerman ES, Heibeck TH, Gill A, et al. Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. *Bioconjugate Chem. Bioconjugate Chem*, 2014, 25(2): 351–361.
- [51] Hirao I, Ohtsuki T, Fujiwara T, et al. An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(2): 177–182.
- [52] Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem*, 2008, 389: 521–536.
- [53] Bundy BC, Franciszkowicz MJ, Swartz JR. *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(1): 28–37.
- [54] Patel KG, Swartz JR. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide–alkyne click chemistry. *Bioconjug Chem*, 2011, 22(3): 376–387.
- [55] Bundy BC, Swartz JR. Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *J Biotechnol*, 2011, 154: 230–239.
- [56] Ishihara G, Goto M, Saeki M, et al. Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr Purif*, 2005, 41(1): 27–37.
- [57] Klammt C, Schwarz D, Fendler K, et al. Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J*, 2005, 272(23): 6024–6038.
- [58] Klammt C, Löhner F, Schäfer B, et al. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem*, 2004, 271(3): 568–580.

- [59] Goren MA, Fox BG. Wheat germ cell-free translation, purification, and assembly of a functional human stearoyl-CoA desaturase complex. *Protein Expr Purif*, 2008, 62(2): 171–178.
- [60] Lian J, Fang X, Cai J, et al. Efficient expression of membrane-bound water channel protein (Aquaporin Z) in *Escherichia coli*. *Protein Pept Lett*, 2008, 15(7): 687–691.
- [61] Xu Z, Lian J, Cai J. Efficient expression of Aquaporin Z in *Escherichia coli* cell-free system using different fusion vectors. *Protein Pept Lett*, 2010, 17(2): 181–185.
- [62] Lian J, Ding S, Cai J, et al. Improving aquaporin Z expression in *Escherichia coli* by fusion partners and subsequent condition optimization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(3): 463–470.
- [63] Kai L, Kaldenhoff R, Lian J, et al. Preparative scale production of functional mouse aquaporin 4 using different cell-free expression modes. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12972.
- [64] Yang Z, Ma R, Huang L, et al. High-level production of soluble adenine nucleotide translocator from *Schistosoma japonicum* in *E. coli* cell-free system. *Process Biochem*, 2012, 47(3): 395–400.
- [65] Yamamoto T, Hino M, Kakuhata R, et al. Evaluation of cell-free protein synthesis using PDMS-based microreactor arrays. *Anal Sci*, 2008, 24(2): 243–246.
- [66] Shima Y, Sato K, Bayashi MW, et al. Synthesis of functional protein in liposome. *J Biosci Biochem*, 2001, 92(6): 590–593.
- [67] Brodel AK, Sonnabend A, Kubick S. Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(1): 25–36.
- [68] Noireaux V, Bar-Ziv R, Libchaber A. Principles of cell-free genetic circuit assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(22): 12672–12677.

(本文责编 陈宏宇)