

不同细胞破碎方法对无细胞蛋白表达系统细胞抽提物活性的影响*

王雪^{1,2} 权春善^{3**} 王建华^{1,2} 范圣第^{3**}

(1 中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023 2 中国科学院研究生院 北京 100049)

(3 大连民族学院生物化学工程国家民委-教育部重点实验室 大连 116600)

摘要 无细胞蛋白表达系统由于能够有效表达膜蛋白等有毒性蛋白,因此近二十年受到了关注,其蛋白表达产率有了显著的提高。细胞抽提物活性的高低是无细胞蛋白表达系统高效运行的关键,若找到简单易行的活性评估方法,将大大降低成本及时间。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH) 是糖代谢的戊糖磷酸途径中的关键调控酶,该酶可以被用来评估细胞抽提物的活性。以 G-6-PDH 的活性为指标对无细胞蛋白表达系统中的抽提物活性进行评价,并利用 G-6-PDH 活性评价体系对机械破碎、高压破碎以及超声破碎三种破碎方法进行了比较,得出了三种破碎方法的最佳破碎条件。机械破碎最佳破碎条件是 5 000r/min,用直径 0.1 mm 玻璃珠,破碎 6 次;高压破碎的最佳破碎压力为 1 300bar;超声破碎最佳破碎条件是功率强度为总功率的 60%,破碎 30 次。酶活性测定结果显示机械破碎和超声破碎得到的抽提物活性比高压破碎得到的抽提物活性略高。

关键词 无细胞蛋白表达系统 G-6-PDH 破碎方法 抽提物活性

中图分类号 Q816

无细胞蛋白表达系统是一种以外源 mRNA 或 DNA 为模板,在细胞抽提物的酶系中补充底物,能量以及其它辅助因子来合成蛋白质的体外蛋白表达系统。早在 20 世纪 60 年代,Nirenberg 等^[1]就利用大肠杆菌无细胞系统来分析遗传密码,研究 mRNA 是如何翻译成有活性的蛋白质。随着基因组学、蛋白质组学以及代谢组学时代的到来,无细胞蛋白表达系统凭借其优点在近二十年受到了研究者的广泛关注。与传统的活体表达蛋白相比,无细胞蛋白合成系统具有以下优点:(1)由于无细胞蛋白合成系统并不是在细胞中合成蛋白,因此在表达膜蛋白以及细胞毒性蛋白方面有明显优势;(2)可以直接以质粒或 PCR 产物为模板来表达蛋白质;(3)无细胞蛋白合成系统还能够表达含有非天然氨基酸的蛋白;(4)操作者可以直接对无细胞蛋白表达系统进行控制;(5)可以同时表达多种蛋白,进行蛋白筛

选,等等。

正是由于无细胞蛋白合成系统具有体内表达无可比拟的优点,在近二十年来,无细胞蛋白合成技术发展的非常迅速。通常细胞抽提物的制备步骤包括多次的离心及透析等步骤^[2],耗时较长,因此能否制备高质量的细胞抽提物成为制约无细胞表达能否顺利进行的关键因素。James 等^[3]考察了离心及透析次数对细胞抽提物的影响,结果表明经过步骤简化后得到的抽提物的蛋白表达产率并未受到明显影响。同时, Kim 等^[4]也对细胞抽提物的制备过程进行了优化,结果显示菌体细胞破碎后经过 12 000g 离心 10 分钟得到的抽提物同样能够满足体外蛋白表达的要求。

虽然无细胞蛋白合成技术在近年来有很大进展,但是大部分的研究主要集中于如何提高蛋白合成的产率^[5-7],延长反应时间^[8-9]以及如何降低实验成本^[10]等方面,并没有一种方法能够对获得的抽提物的活性进行直接评估。抽提物的活性高低直接与蛋白产率相

收稿日期:2010-09-02 修回日期:2010-10-21

* 教育部科学技术重点资助项目(DC10020101)

** 通讯作者,电子邮箱:mikyeken@dlnu.edu.cn;fsd@dlnu.edu.cn

关,如果能够在进行无细胞蛋白表达之前对抽提物活性进行评估,不仅能够避免时间和药品资源的浪费,也能够帮助科研人员及时找出影响蛋白表达的因素。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH)是糖代谢的戊糖磷酸途径中的一种重要的酶,戊糖磷酸途径是微生物中普遍存在的一条糖的分解代谢途径。G-6-PDH 活性的大小通常被用来指示细胞破坏程度及胞内物的活性^[11]。通过测量抽提物中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性来评估抽提物活性,对机械破碎、高压破碎以及超声破碎三种方法进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

Escherichia coli BL21 codon-plus RIL 菌株由本实验室保存。蛋白胨,酵母粉,氯化钠,Tris-base,乙酸镁,乙酸钾,氯化镁,DTT,2-巯基乙醇,氯化镁,葡萄糖-6-磷酸,NAD,DEPC 等试剂均购自上海生工,马来酰亚胺购自 Sigma 公司。

2 × YT 培养基:蛋白胨 16g,酵母提取物 10g,氯化钠 5g,溶于 0.9L 水,调 pH 至 8.0,定容至 1L,121℃,高压灭菌 15min。

S30A 缓冲液:10mmol/L Tris-acetate (pH8.2),14mmol/L 乙酸镁,0.6mmol/L 乙酸钾,1mmol/L 二硫苏糖醇。

S30B 缓冲液:10mmol/L Tris-acetate (pH8.2),14mmol/L 乙酸镁,0.6mmol/L 乙酸钾,1mmol/L 二硫苏糖醇,0.5ml/L 2-巯基乙醇。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌生长曲线的测定 挑取 *E. coli* BL21 codon-plus RIL 单菌落接入含有氯霉素的 2 × YT 培养基中,过夜培养。次日按照 1% 的接种量接到同样含有氯霉素的 2 × YT 培养基中,37℃,180r/min 培养,每隔 1h 取样,测量菌液的 OD₆₀₀,以水为参照。

1.2.2 机械破碎 在培养 3h 后收集细菌,得到的菌体用 S30A 缓冲液重复洗涤 3 次,最后每克菌体重悬于 1.27ml S30B 缓冲液中,进行破碎。破碎液在 4℃ 条件下 12 000r/min,离心 30min,取上清。然后在 37℃ 下温育 1h,最后在 4℃ 12 000r/min,离心 10min,取上清。

在制备大肠杆菌抽提物时,一般较少采用机械破碎方法,以 Kigawa 等^[2]的破碎方法为参考,主要考察玻璃珠直径、转速以及破碎次数等因素对破碎效果的影响。为了考察各因素对破碎程度以及破碎抽提物酶活

性的影响,实验使用机械破碎仪(Micro Smash MS-100, TOMY, Japan),对影响破碎的各种破碎因素进行了正交优化,正交实验的各因素及水平见表 1,采用三因素四水平正交表进行正交实验,正交实验安排见表 2。

表 1 机械破碎正交实验因素水平表

Table 1 The level of mechanical disrupting orthogonal factor

因素 水平	A 转速(r/min)	B 次数	C 直径(mm)
1	2 000	3	0.1
2	3 000	4	0.5
3	4 000	5	0.1
4	5 000	6	0.5

表 2 机械破碎正交实验表

Table 2 The mechanical disrupting orthogonal table

实验号	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	1	4	4
5	2	1	2
6	2	2	1
7	2	3	4
8	2	4	3
9	3	1	3
10	3	2	4
11	3	3	1
12	3	4	2
13	4	1	4
14	4	2	3
15	4	3	2
16	4	4	1

1.2.3 高压破碎 在使用高压细胞破碎仪(JN3000-PLUS,广州聚能生物有限公司)前,用 DEPC 水清洗仪器,同时预冷仪器。菌体破碎前处理和破碎后处理与机械破碎法相同。考察不同压力下菌体的破碎程度,破碎压力分别为:1 000bar、1 100 bar、1 200 bar、1 300 bar、1 400 bar。每个压力下破碎进行 3 次。

1.2.4 超声破碎 实验所用超声破碎仪(VCX130,sonics,USA)功率为 130W,在功率强度为 60%,80%,100%进行破碎,每个强度分别进行 10 次,20 次,30 次破碎,单次破碎 10 秒,冰浴 30 秒。破碎操作在冰盒中进行。

1.2.5 G-6-PDH 活性测定 1.5ml 的 G-6-PDH 酶活性测定体系为:0.38mmol/L nicotinamide adenine dinucleotide (NAD),3.3mmol/L 葡萄糖-6-磷酸,6.3mmol/L MgCl₂,

50mmol/L Tris-缓冲液, 5mmol/L 马来酰亚胺, 100 μ l 大肠杆菌细胞抽提物。通过测量酶反应 1h 前、后, 由 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 的减少所引起的反应体系在 340 nm 处吸光度的增加来表示 G-6-PDH 的活性。酶活性 = $100 \Delta OD_{340} \times 1.5 \times 10^3 / 0.1ed$ (U/ml), 每小时生成 0.01mg 的 NADPH 为一个酶活力单位, 其中 e 为质量吸光系数, 7.46ml/(mg·cm), d 为比色杯光径, 1cm。

2 结果与分析

2.1 *E. coli* BL21 codon-plus RIL 生长曲线

E. coli BL21 codon-plus RIL 在接种 0~1 h 内菌体生长较缓慢, 处于延滞期, 接种 2h 后细菌进入对数生长期, 到 4h 后, 菌液的 OD₆₀₀ 变化不显著, 菌体生长基本进入稳定期。在接种后 2~4h 时间内, 细菌快速分裂, 代谢旺盛, 在此时间段收集菌体得到的抽提物能够有较高的活性。根据初步实验, 确定接种后 3 h 收集的菌体活性最高。考虑到实际培养时存在的差异, 在控制时间的同时也检测 OD₆₀₀ 的值, 选择 OD₆₀₀ 在 1.0 时收集菌体。

2.2 机械破碎对抽提物中 G-6-PDH 活性的影响

机械破碎是将经过处理的细小玻璃珠加入到待破碎的菌液中, 在高速旋转和上下震动过程中, 玻璃珠与菌体细胞产生激烈碰撞, 从而达到破碎的目的。由于剧烈碰撞会产生大量的热量, 因此机械破碎不能持续进行, 要及时的将产生的热量散发出去。通常情况下, 影响机械破碎的因素主要有转速、玻璃珠直径和破碎次数。绘制机械破碎正交实验得到的细胞抽提物活性的柱形图 (图 1)。

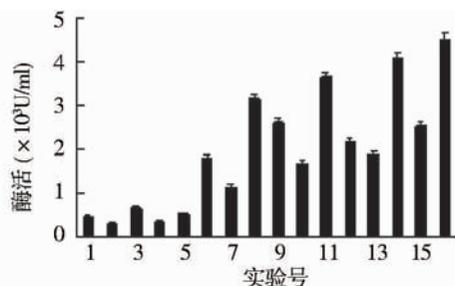


图 1 机械破碎正交实验得到的抽提物中 G-6-PDH 的活性

Fig. 1 The G-6-PDH activity of the extract in the mechanical crushing orthogonal

对机械正交破碎得到的抽提物的酶活性测定结果做

极差分析, 可以得出机械破碎各因素影响抽提物酶活性的次序分别为: 转速 > 玻璃珠直径 > 破碎次数。对于同一批待破碎样品, 获得最佳抽提物活性的破碎条件是转速 5 000r/min, 玻璃珠直径 0.1mm, 破碎 6 次。由图 1 还可以看出, 利用机械破碎制备抽提物的转速不应低于 3 000r/min, 低于 3 000r/min 时抽提物的活性明显降低。由于 5 000r/min 已经是机械破碎较高的转速, 更高转速有可能破坏蛋白的高级结构, 使得酶活性降低, 因此并未做转速超过 5 000r/min 条件下的破碎实验。

2.3 高压破碎对抽提物中 G-6-PDH 活性的影响

高压破碎是在利用超高压能量使样品通过狭缝瞬间释放, 在剪切效应、空穴效应、碰撞效应的作用下使细胞破碎, 使物质均质、分散、乳化、颗粒纳米化。破碎全过程在 4 $^{\circ}$ C 循环水浴中进行, 保持原有物质的活性。压力是影响破碎结果的主要因素, 测定不同压力下得到的抽提物中 G-6-PDH 活性 (图 2)。

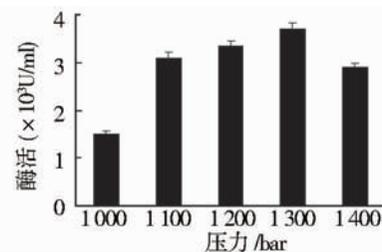


图 2 不同压力下制得抽提物中 G-6-PDH 的活性

Fig. 2 The activity of G-6-PDH in the extract at different pressure

由图 2 可以看出, 在 1 000bar 压力下得到的抽提物活性仅相当于 1 100bar 压力下得到的抽提物活性的一半, 说明当破碎压力低于 1 100bar 时, 得到的抽提物的活性很低, 要获得具有较高活性的抽提物, 破碎压力至少应为 1 100bar。当破碎压力为 1 300bar 时得到的抽提物活性最高, 继续提高破碎压力, 得到的抽提物的活性反而降低。原因有可能是高压气流使得蛋白质的高级结构发生了变化, 部分蛋白失去活性, 使得 1 400bar 压力下的抽提物活性比 1 300bar 下的抽提物活性低。

2.4 超声破碎对抽提物中 G-6-PDH 活性影响

超声破碎就将电能通过换能器转换为声能, 这种能量通过液体介质变成一个个密集的小气泡, 小气泡迅速炸裂, 产生巨大能量, 从而起到破碎细胞的作用。影响破碎效果的因素主要有破碎时的功率强度及破碎次数。绘制不同功率强度下不同破碎次数得到的抽提物的活性图 (图 3)。

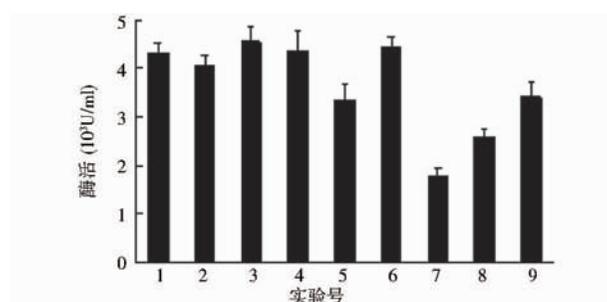


图3 超声破碎制得的抽提物中G-6-PDH的活性

Fig. 3 The G-6-PDH activity of extract by sonication

1~3:130w×60%,10,20,30 times;4~6:130w×80%,
10,20,30 times;7~9:130w×100%,10,20,30 times

由图3可以看出,1~6号实验得到的抽提物的酶活性要显著高于7、8、9号实验,说明用100%功率来破碎细胞时,有可能功率过大,使得酶受到破坏,活性受到影响。功率强度为60%和80%时,得到的抽提物的活性并没有很大差别,而且在这两个功率水平,破碎次数对抽提物活性并没有很大影响。与机械破碎和高压破碎相比,超声破碎得到的细胞抽提物的活性大小并没有呈现较明显的规律性。

3 讨论

近年来无细胞蛋白合成系统凭借其优势得到了迅速的发展,但是尚未发现关于评估抽提物活性的报道。通过测量抽提物中的G-6-PDH活性来评价细胞抽提物活性,比较了机械破碎、高压破碎以及超声破碎三种破碎方法得到的细胞抽提物的活性大小,得到了三种破碎方法的最适宜破碎条件。利用这种方法在进行无细胞表达蛋白之前对抽提物的活性进行评估,及时选择活性较高的抽提物进行后续实验,为无细胞蛋白表达系统提供了一个对抽提物活性进行测定的平台。

大部分文献都是采用高压破碎法对菌体进行破碎来制备抽提物,但是通过对机械破碎、高压破碎和超声破碎三种破碎方法进行活性评估,发现机械破碎和超声破碎得到的抽提物的活性要比高压破碎得到的抽提物活性略微高一些。当在实验室制备少量的细胞抽提物(<5ml)时,机械破碎是最适宜的方法,能够得到活性较高的抽提物。但是当需要大量的制备细胞抽提物(>5ml)时,复杂实验操作限制了机械破碎的使用,超声破碎和高压破碎的优点便显现出来。可能机械破碎

的实验复杂程度和超声破碎的不稳定性影响了这两种破碎方法的使用。

参考文献

- [1] Nirenberg M W, Matthaei J H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1961, 47(10): 1588-1602.
- [2] Kigawa T, Yabuki T, Matsuda N. Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2004, 5(1-2): 63-68.
- [3] James R S, David V L, James F Z. Streamlining *Escherichia coli* S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(2): 460-465.
- [4] Kim K W, Keum J W, Kim D M, 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.
- [5] Seki E, Matsuda N, Kigawa T. Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. *Analytical Biochemistry*, 2008, 377(2): 156-161.
- [6] Seki E, Matsuda N, Kigawa T. Multiple inhibitory factor removal from an *Escherichia coli* cell extract improves cell-free protein synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 108(1): 30-35.
- [7] Nokyoung P, Soong H U, Dan L. A cell-free protein-producing gel. *Nature materials*, 2009, 8: 432-437.
- [8] Kim D M, James R S. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(3): 385-390.
- [9] Michael C J, James R S. Mimicking the *Escherichia coli* cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 86(1): 19-26.
- [10] Kara A C, James R S. An economical method for cell-free protein synthesis using glucose and nucleoside monophosphates. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(4): 1146-1153.
- [11] Lessie T G, Vander Wyk J C. Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases: differences in sizes, pyridine nucleotide specificity, and susceptibility to inhibition by Adenosine 5'-triphosphate. *Journal of Bacteriology*, 1972, 110(3): 1107-1117.

The Influence of Different Cell Disruption Methods on the Activity of the Extract in Cell-free Protein Synthesis System

WANG Xue^{1,2} QUAN Chun-shan³ WANG Jian-hua^{1,2} FAN Sheng-di³

(1 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

(2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 Key Laboratory of Biochemical Engineering, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract Cell-free (CF) protein expression system can be effectively used for membrane protein and other toxic protein expression. In recent two decades, CF system has received wide range of attention and the yield was significantly improved. The extract activity is the critical factor that affects the efficiency of protein synthesis system. If a simple method could be established to evaluate the activity of the extract, lots of time and cost would be saved up. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) was the key regulatory enzyme in the pentose phosphate pathway in the glucose metabolism, therefore the activity of G-6-PDH could be utilized as an indicator to assess the extract activity. A convenient and feasible method was established, which use the activity of G-6-PDH in the extract to evaluate the extract activity. Three kinds cell disruption methods were compared, which included mechanical crushing, high pressure crushing and sonication, and the optimum conditions of each method were obtained. The mechanical crushing method got the most active extract by using 0.1mm-diameter glass beads at 5 000r/min for 6 times. When the disruption pressure was 1 300 bar, the activity of the extract reached the highest point. The sonication method got the best result at 60% power level, 30 cycles. The results indicated that the activity of the extract obtained by mechanical crushing and sonication methods were a little higher than the high pressure disruption.

Key words Cell-free protein synthesis system G-6-PDH Disruption method Extract activity

广告索引

上海伯豪生物技术有限公司(封面), 颇尔过滤器(北京)有限公司(封二), 爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司(彩1), 上海日泰医药设备工程有限公司(彩2), 广州市艾贝泰制药设备科技有限公司(彩3), 上海森松制药设备工程有限公司(彩4), 3M 中国有限公司(彩5), 镇江东方生物工程设备公司(彩6-7), 中国农业展望论坛(彩8), 上海开放生物科技有限公司(彩9), 宝生物工程(大连)有限公司(彩10), Waters(中彩1), 上海国强生化装备工程有限公司(中彩2-3), 第九届中国国际科学仪器展及实验室装备展览会(中彩4), GE imagination at work(封三), 纽英伦生物技术(北京)有限公司(封底)。