

## 大肠杆菌细胞抽提物制备方案的简化与优化

郭新娟<sup>1,2</sup>, 权春善<sup>3</sup>, 赵朋超<sup>1,2</sup>, 王丽娜<sup>1,2</sup>, 范圣第<sup>3</sup>

1 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 大连民族学院生物技术与资源利用国家民委-教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

郭新娟, 权春善, 赵朋超, 等. 大肠杆菌细胞抽提物制备方案的简化与优化. 生物工程学报, 2013, 29(4): 532-535.  
XJ Guo, Quan CS, Zhao PC, et al. Simplification and optimization of the preparation of *Escherichia coli* extract for cell-free protein expression. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 532-535.

**摘要:** 无细胞蛋白表达系统是一种将目的蛋白在体外进行表达的新技术和新方法, 已广泛应用到蛋白质组学、蛋白质结构和功能等领域的研究中。在无细胞蛋白表达系统中, 细胞抽提物的制备是关键因素之一。通过对大肠杆菌细胞抽提物制备过程中离心速度、预孵化和透析等参数的考察, 利用绿色荧光蛋白作为报告蛋白, 可以得到一个细胞抽提物制备的简化方案。采用相对低的转速 (12 000×g, 10 min), 简易空孵即可制备出活性高的细胞抽提物, 用于无细胞体系蛋白表达, 其表达的绿色荧光蛋白产量为 209 μg/mL。与传统的大肠杆菌细胞抽提物 S30 相比较, 新方案将使时间与成本节省 62%, 产量是传统方法的 2.6 倍, 使无细胞蛋白表达技术的操作快速、高通量的优势更加明显。

**关键词:** 蛋白质表达, 无细胞表达系统, 细胞抽提物, 大肠杆菌, 体外表达

## Simplification and optimization of the preparation of *Escherichia coli* extract for cell-free protein expression

Xinjuan Guo<sup>1,2</sup>, Chunshan Quan<sup>3</sup>, Pengchao Zhao<sup>1,2</sup>, Lina Wang<sup>1,2</sup>, and Shengdi Fan<sup>3</sup>

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

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Key Laboratory of Biotechnology and Resource Utilization, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning, China

**Abstract:** Cell-free protein expression system is a new method to express target protein *in vitro* and has been widely

**Received:** November 16, 2012; **Accepted:** January 14, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21152002), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. DC12010118).

**Corresponding author:** Chunshan Quan. Tel: +86-411-87656219; Fax: +86-411-87644496; E-mail: mikyeken@dlnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21152002), 中央高校专项基金 (No. DC12010118) 资助。

网络出版时间: 2013-01-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130117.1629.001.html>

applied to the study of protein structure, protein function and other related fields. Preparation of cell extract is one of the key factors that affect the efficiency of the cell-free system. To improve the efficiency and economical feasibility of cell-free protein synthesis, we discussed the parameters during the preparation of the cell extract. These parameters include centrifugation speed, pre-incubation, and dialysis. We used the green fluorescent protein as the reporter protein, and obtained a simple procedure for the preparation of *Escherichia coli* cell extract. A simple centrifugation step (12 000×g, 10 min) followed by a brief incubation was sufficient for the preparation of an active cell extract to support protein expression with higher productivity (209 μg/mL). Compared to the traditional *E. coli* S30 procedure, the processing time was reduced by 62%, and the productivity was increased by 2.6 times. The new procedure will make the advantage of cell-free technology more obvious, and promote its wider application.

**Keywords:** protein synthesis, cell-free expression system, cell extract, *Escherichia coli*, *in vitro*

表达蛋白的传统方法是采用重组载体,在宿主菌体内表达,这种方式有诸多缺点:表达量低、细胞毒性大、易形成包涵体等<sup>[1]</sup>。利用无细胞系统体外表达蛋白,克服了上述缺点,具有操作快速、高通量、表达量高和不形成包涵体等优点<sup>[2-4]</sup>。无细胞系统体外表达蛋白<sup>[5]</sup>,可根据具体需要,介入对表达条件的调控和修饰,如加入脂质、表面活性剂等物质<sup>[6]</sup>。细胞抽提物是无细胞蛋白表达系统中的一个重要组分,其活性高低直接影响目的蛋白的产量。细胞抽提物的制备成本高、步骤繁琐,传统的制备方法费时费力。尽管如此,对于无细胞体系,大部分研究主要集中在提高蛋白产率<sup>[7-10]</sup>,延长反应时间<sup>[11-12]</sup>等方面,对于细胞抽提物制备方法的研究较少。

大肠杆菌细胞抽提物的传统制备方法是 1984 年由 Pratt<sup>[13]</sup>建立的,称之为 S30 抽提物,是目前绝大多数研究者所采用的方法。Swartz 等<sup>[14]</sup>研究简化了 S30 制备的步骤,但依旧较繁琐。Kim 等<sup>[15]</sup>采用无细胞体系表达氯霉素乙酰转移酶,简化了抽提物的制备。本文在前人<sup>[5,14-15]</sup>的研究基础上,致力于研究简单高效的抽提物制备方法,即采用大肠杆菌 BL21 (DE3) Codon-Plus RIL 菌株,考察不同制备方法对绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 表达的影响,得到一个简化方案:采用相对低的离心速度 (12 000×g, 10 min) 和简易空孵化即可制备出活性高的细胞抽提物,其表达的 GFP 产量为

209 μg/mL。与传统 S30 相比,新方案节省了 62% 的时间与成本,并使 GFP 产量提高至 2.6 倍。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒 pET28a (+)-GFP 用作无细胞体系的模板。*E. coli* BL21 (DE3) Codon-Plus RIL 菌株用于细胞抽提物的制备。透析管 (MWCO=15K) 购自 Spectrum 公司;培养基、三羟甲基氨基甲烷 (Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris), 乙酸和乙酸钾购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;磷酸烯醇式丙酮酸和磷酸激酶购自罗氏公司;质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司;其他试剂购自 SIGMA-ALDRICH 公司。

S30 缓冲液 A/B: 10 mmol/L Tris- 乙酸 (pH 8.2), 14 mmol/L 乙酸镁, 60 mmol/L 乙酸钾, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.5 mL/L 2-巯基乙醇 (仅缓冲液 A 中含有)。

预孵化缓冲液: 293 mmol/L Tris- 乙酸 (pH 8.2), 9.2 mmol/L 乙酸镁, 13.2 mmol/L 腺嘌呤核苷三磷酸 (pH 7.0), 84 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸 (pH 7.0), 4.4 mmol/L 二硫苏糖醇, 20 种氨基酸均 40 mmol/L, 6.7 U/mL 磷酸激酶。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大肠杆菌细胞抽提物的制备

本实验采用 5 种流程制备大肠杆菌细胞抽提

物, 分别是: 标准 S30、较筒 S30、S12、较筒 S12 和最筒 S12 抽提物。

标准 S30 抽提物的制备参照 Pratt<sup>[13]</sup>的方法。将种子液接到 2×YT 培养基, 30 °C 培养。待  $OD_{600}$  达到 0.6, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)。 $OD_{600}\approx 3$  时, 离心收菌。将每克湿菌体用 20 mL S30 缓冲液 A 在 4 °C 下冲洗 3 次, 在液氮中浸 2 min 后保存于 -70 °C, 1~3 d。将细胞用 S30 缓冲液 A 解冻重悬, 4 °C 下离心收集, 每克菌体重悬于 1.27 mL 的 S30 缓冲液 B 中。130 MPa 的压强下, 高压破碎菌体 3 次。立即离心 2 次 (4 °C, 30 000×g, 30 min), 取上清。加入 0.3 倍体积的预孵化缓冲液, 37 °C 孵育 80 min。之后将粗提物装入透析管中, 每 7 g 湿菌在 750 mL S30 缓冲液 B 中 4 °C 下透析 4 次, 每次 45 min。4 °C、4 000×g 离心 10 min, 吸取上清, 分装至离心管中, 在液氮中浸 2 min, 贮存于 -70 °C。较筒 S30 抽提物的制备参照 Swartz 等<sup>[14]</sup>的方法, 与标准 S30 相比不同之处是: 空孵化并缩短透析时间 (上清 37 °C 下孵育 80 min, 粗提物透析 40 min)。S12 抽提物的制备与标准 S30 相比不同之处是: 收集的菌体用 S30 缓冲液 A 重悬 1 次, 浸液氮后保存, 之后将细胞在 S30 缓冲液 B 中解冻重悬便破碎, 离心 1 次 (4 °C, 12 000×g, 10 min)。较筒 S12 抽提物的制备与 S12 相比不同之处是: 空孵化并简易透析 (37 °C 孵育 80 min, 粗提物透析 40 min)。最筒 S12 抽提物的制备与较筒 S12 相比不同之处是: 简易空孵化, 即上清孵育 30 min 便分装贮存。

### 1.2.2 无细胞体系蛋白表达

无细胞体系采用批量式, 在 1.5 mL 离心管中, 30 °C、180 r/min 反应 4 h。60  $\mu$ L 的反应体系在 Kigawa 等<sup>[16]</sup>的基础上作了修改: 10.7 mmol/L 乙酸镁, 2.5  $\mu$ g/mL 肌酸激酶, 20  $\mu$ g/mL 模板 pET28a(+)-GFP, 1 mmol/L IPTG, 24% (V/V) 细胞抽提物。采用 5 种细胞抽提物分别进行无细胞蛋白表达, 同种抽提物的体系分 2 组: 加入和未加模板, 共 10 组反应体系。

### 1.2.3 无细胞体系反应产物的分析

无细胞体系的反应物经丙酮沉淀后用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上样缓冲液溶解, 37 °C 水浴 5 min。上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后将凝胶置于紫外下观测荧光, 随后采用考马斯亮蓝染色。

GFP 蛋白带有 His 标签, 因此可进行 Western blotting 检测: 将电泳后的凝胶转到膜上, 经过封闭和抗体孵育, 最后显色。

采用荧光分析仪测量反应后体系的荧光强度来得到 GFP 蛋白的表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同细胞抽提物对 GFP 表达量的影响

由 SDS-PAGE 电泳 (图未显示) 和 Western blotting 检测 (图 1) 可知, 10 组抽提物的无细胞体系中, 加入模板的体系均有 GFP 蛋白表达, 未加模板的体系均无表达。采用蛋白凝胶电泳分析软件, 结合蛋白标准的上样量, 得到“最筒 S12 抽提物”的表达水平为 209  $\mu$ g/mL。

将电泳凝胶在染色前置于紫外下观测荧光 (图未显示): 只有 9 号体系能明显观察到荧光。这表明“最筒 S12 抽提物”活性最好, 其反应体系的 GFP 表达量最高。2、4、6、8、10 体系未加模板, 无 GFP 表达, 故未见荧光。1、3、5、7 号体系由于 GFP 表达量较少, 故不能明显观察到荧光。

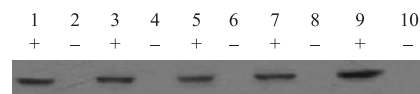


图 1 GFP 蛋白的 Western blotting 检测图

Fig. 1 Western blotting analysis of GFP expressed in cell-free systems with different cell extracts. Cell-free systems containing different cell extracts with (+), or without (-) DNA template. 1, 2: standard S30 extract; 3, 4: the simpler S30 extract; 5, 6: S12 extract; 7, 8: the simpler S12 extract; 9, 10: the simplest S12 extract.

利用荧光分析仪测量反应后体系的荧光强度得到无细胞体系的相对荧光强度(图2)。由结果可见抽提物的产量由大到小顺序是:最简 S12>较筒 S30>较筒 S12>标准 S30>S12。

## 2.2 细胞抽提物的不同制备方法对工作量的影响

我们分析了不同制备方法消耗时间的差别:标准 S30 耗时最多,约 11 h;最简 S12 流程最简单快速,耗时约 4 h,相比标准 S30,节省了 62%的时间和成本,产量也提高到 2.6 倍,尤其适合于自动化和高通量的蛋白质组学等领域。

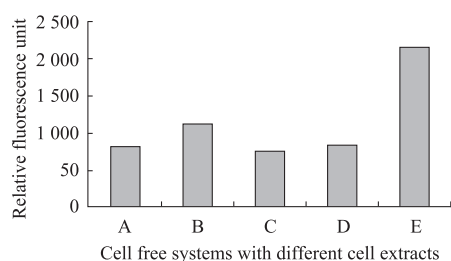


图 2 不同无细胞体系中 GFP 的表达量柱状图

Fig. 2 Production yield of GFP synthesized in different cell-free systems. A: the standard S30 extract; B: the simpler S30 extract; C: S12 extract; D: the simpler S12 extract; E: the simplest S12 extract.

强化细胞抽提物效率是提高无细胞蛋白表达体系产量的一个关键和重要因素。本研究将为无细胞技术的发展提供理论基础。S12 比 S30 的表达量高,可能是因为相对低的离心速度保留了较多的功能蛋白,有利于无细胞体系蛋白的表达。至于不同离心转速、预孵化和透析改变了什么,不同细胞抽提物的活性物质含量的差别等,还有待进一步深入研究。

## REFERENCES

[1] Kefala G, Kwiatkowski W, Esquivies L, et al. Application of Mystic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from *Escherichia coli*. *J Struct Funct Genomics*, 2007, 8(4):167-172.

[2] Katzen F, Peterson TC, Kudlicki W. Membrane protein expression: no cells required. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(8): 455-460.

[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] Nakano H, Yamane T. Cell-free protein synthesis systems. *Biotechnol Adv*, 1998, 16(2): 367-384.

[5] Kigawa T, Yabuki T, Matsuda N, et al. Preparation of *E. coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J Struct Funct Genomics*, 2004, 5(1-2): 63-68.

[6] Klammt C, Schwarz D, Lohr F, et al. Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J*, 2006, 273(18): 4141-4153.

[7] Seki E, Matsuda N, Yokoyama S, et al. Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. *Anal Biochem*, 2008, 377(2): 156-161.

[8] Shimono K, Goto M, Kikukawa T, et al. Production of functional bacteriorhodopsin by an *Escherichia coli* cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid. *Protein Sci*, 2009, 18(10): 2160-2171.

[9] Seki E, Matsuda N, Kigawa T. Multiple inhibitory factor removal from an *Escherichia coli* cell extract improves cell-free protein synthesis. *J Biosci Bioeng*, 2009, 108(1): 30-35.

[10] Park N, Um SH, Funabashi H, et al. A cell-free protein-producing gel. *Nat Mater*, 2009, 8(5): 432-437.

[11] Kim DM, Swartz JR. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(3): 385-390.

[12] Kim D-M, Swartz JR. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 66(3): 180-188.

[13] Pratt J. *Transcription and Translation: A Practical Approach*. New York: IRL Press, 1984: 179-209.

[14] Liu DV, Zawada JF, Swartz JR. Streamlining *Escherichia coli* S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(2): 460-465.

[15] Kim TW, Keum JW, Oh IS, et al. Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol*, 2006, 126(4): 554-561.

[16] Endo Y, Takai K, Ueda T. *Cell-Free Protein Production: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2010: 2-6.

(本文责编 陈宏宇)