





论文题目:原核体外翻译系统全重构与优化

- 姓 名:朱德昊 学 号:17307110075
- 院 系: 生命科学学院
- 专 业: 生物科学
- 指导教师:林金钟 职 称:教授
- 单 位:复旦大学生命科学学院
- 完成日期: 2021年 5月 26日

原核体外翻译系统全重构与优化

# 完成人 朱德昊

## 指导小组成员

## 林金钟 教授

目	录	

摘	要	I
Abs	tract.	II
_,	前言	ة ١
<u> </u>	材料	斗与方法4
	2.1 才	材料4
	2	2.1.1 菌种与感受态细胞4
	2	2.1.2 质粒载体4
	2.2 ì	试剂与仪器5
	2	2.2.1 试剂5
	2	2.2.2 仪器及耗材7
	2.3 5	实验方法
	2	2.3.1 细胞培养
	2	2.3.2 E. coli 70S 核糖体纯化
	2	2.3.3 蛋白质纯化9
	2	2.3.4 PURE 蛋白质生产与检测10
	2	2.3.5 SDS-PAGE 和 Western Blot13
三,	研究	飞结果15
	3.1 C	CAPTO CORE 700 可用于 PURE 核糖体的有效纯化15
	3.2 ‡	批量补充 PURE 所含的翻译相关因子及核糖体来改善翻译效率17

3.	.3 改变 PURE 系统中非蛋白成分来改善翻译效率	22
3.	.4 向 PURE 中添加额外的翻译因子	25
四、ì	讨论	27
参考了	文献	31
致谢.		34

## 摘要

无细胞蛋白质合成系统 (CFPS) 指不使用活细胞的蛋白质翻译体系。目前普 遍使用的 CFPS 系统主要包括基于大肠杆菌 S30 提取物的体系 (ECE) 与基于重 组表达纯化翻译过程所需的最小成分,再体外组装的重组型体外翻译系统 (PURE)。其中,PURE 因其组分纯净的独特优势而在合成生物学上具有重要用 途。尽管如此,PURE 在翻译效率上却并不如 ECE 体系。开发一个具有高翻译效 率的 PURE 系统将弥补 PURE 的一大短板。在本项研究中,我们以绿色荧光蛋 白 (eGFP)、微小荧光素酶 (Nanoluc) 和β-半乳糖苷酶 (β-gal) 作为底物报告 PURE 的翻译效率。在此基础上,我们试图通过调整 PURE 中的关键蛋白与非蛋 白成分 (包括氨酰基-tRNA 合成酶、翻译因子、T7 RNA 聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、磷酸肌 酸、精胺以及反应缓冲液基质)以提升 PURE 的产能。本项工作提供了一个更高 效的 PURE 体外翻译系统,并对制约 PURE 的因素作出剖析。由于国内仍然处 于 PURE 系统研究的起步阶段,该工作将极大推进国内重组型体外翻译系统相 关应用的发展。

关键词: 重组型体外翻译系统, 翻译, 无细胞蛋白质合成

### Abstract

Cell-free protein synthesis system (CFPS) refers to a protein translation system that does not use living cells. Currently, commonly used CFPS systems mainly include systems based on E. coli S30 extract (ECE) and the Protein synthesis Using Recombinant Elements (PURE) system that based on in vitro assembly of purified minimum components required for the translation process. Among them, PURE has important applications in synthetic biology due to its unique advantages of controllable, high-purity components. However, PURE is not as efficient as the ECE system in terms of translation efficiency. Improving the translation efficiency of PURE system has been long-pursued goal in the field of in-vitro translation. In this study, we used Green Fluorescent Protein (eGFP), Nanoluciferase (Nanoluc) and  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) as reporters of the translation efficiency of PURE. We then tried to adjust the key protein and non-protein components of PURE (including aminoacyl-tRNA synthetases, translation factors, T7 RNA polymerase, Mg<sup>2+</sup>, creatine phosphate, spermine and the reaction buffer matrix) to Increase the productivity of PURE. Our work provides a more efficient PURE in vitro translation system and analyzes the factors that restrict the potential of PURE.

**Key Words:** Protein synthesis Using Recombinant Elements, translation, cell-free protein synthesis

一、前言

体外翻译系统(CFPS)指不使用活细胞,仅使用细胞内部分活性成分的蛋白质 表达系统<sup>[1]</sup>。由于没有细胞壁以及细胞稳态等一系列条件的限制,CFPS 具有极 高的开放性。相对于使用细胞进行蛋白质表达,在CFPS 中更加容易实现对翻译 条件的控制,且 CFPS 可以将体系中所有的能量供给全部分配给蛋白质的生产, 相比于细胞是一种更加高效,更加多产的蛋白质生产方式。此外,由于无需将表 达蛋白的载体转运入活细胞,使用 CFPS 系统可以更快速地获取目的蛋白,十分 适合在诸如 COVID-19 疫苗科研攻关等紧急情况下的快速蛋白质生产。在过去的 60 年中,已有许多种类的 CFPS 系统被开发和优化<sup>[2]</sup>,而如今优化 CFPS 的研究 仍然方兴未艾<sup>[3]</sup>。

在诸多原核和真核的 CFPS 系统中,基于大肠杆菌的 CFPS 是目前最广泛使用的一类,具有着高产量、低成本等一系列优势<sup>[1]</sup>,其中一种是基于大肠杆菌 S30 裂解提取物的 CFPS (ECE)。ECE 是一种功能强大但是复杂而不确定的系统,其实验结果会因为操作员的不同或者实验条件的不一致而产生较大的差异,因而不能作为研究代谢工程和核糖体生物化学的理想工具<sup>[4]</sup>。此外,ECE 由于采用的是细菌自带的翻译系统,因而基本仅能够进行蛋白质的表达,而不允许对体系进行修饰和改动,我们亦不能够对体系中的所有组分进行精确定量的控制。

在 2001 年, Shimizu 等的一项开创性研究提出, 通过体外表达纯化大肠杆菌 蛋白质翻译机器中必须的组分, 再于体外重新混合, 可获得一个具有翻译活性的 蛋白质核糖体混合液, 并将其称为 PURE 系统(重组蛋白体外翻译系统)<sup>[5]</sup>。与 ECE 相比, PURE 具有显著优势:由于添加了能量循环系统, PURE 的翻译反应 能够理论上持续很长时间, 直至核糖体活性下降, 因而有更高的蛋白质产量<sup>[6]</sup>。 此外, PURE 系统并不像 ECE 一样包含 DNase, RNase 和蛋白酶, 因而其翻译反 应的稳定性得到提升, 可重复性更强, 更适用于研究翻译的生化过程, 也可以用 于诸如核糖体展示等的翻译相关复合物较为稳定的获取<sup>[7]</sup>。最重要的一点是, 我 们对于 PURE 系统的所有组分都能够把握其纯度和确定的浓度, 因而更方便对 体系作出修改, 以研究细胞内一些尚未被完全表征的因子对翻译过程的贡献和影 响。

不幸的是,尽管 PURE 系统具有诸多优势,但其构建过程至少涉及 36 种蛋 白以及核糖体的大规模纯化,其中任何一种蛋白的活性失常都有可能影响翻译的 进行,这一点极大程度地限制了 PURE 系统的构建。尽管 PURE 存在商用试剂 盒(PURE*frex*,GeneFrontier Corporation(GFC)),但其高昂的价格(0.664 USD/µL) 仍然限制了 PURE 系统地应用。此外,PURE 系统中的核糖体使用传统的密度梯 度离心方法进行纯化,整体纯化时间需要 5 天,且无法进行高通量纯化,这是制 约 PURE 体系组装的另一大因素。

在这里,我们提出了一种多维度改进的 PURE 系统。通过核糖体纯化方式的 优化,对现有 PURE 系统进行翻译相关成分的补充,对 PURE 反应缓冲体系的 优化,以及对 PURE 系统所不包含的非必须翻译因子进行添加,我们将初始 PURE 系统的合成效率提升了 3 倍以上。

在之前的 CFPS 研究中,常见的改进方向是翻译因子的分类添加。先前的工 作已经显示,将纯化的翻译延伸因子(EFs)批量添加至 CFPS 中可以显著提升 CFPS 的产能和合成速率<sup>[8]</sup>。此外,也有报道指出核糖体回收因子(RFs)的浓度 优化可以使 CFPS 的核糖体回收效率达到最优,降低核糖体再循环的时间<sup>[9]</sup>。尽 管已经有这些针对 EFs 和 RFs 的工作,但对于翻译起始因子(IFs)在 CFPS 中 的工作却较为有限。在本工作中,我们尝试将所有 PURE 中的翻译因子作为整体 进行调整,并在此基础上进一步探究大肠杆菌中丰度最高的翻译因子 EF-Tu 的 浓度对 PURE 翻译效率的影响。我们的浓度梯度实验显示,PURE 中最佳的 EF-Tu 浓度为 1400 μg/mL,这一浓度远超其他 PURE 中的翻译因子。此外,由于 ECE 与 PURE 在反应基质上的根本性差异,我们也探讨了 PURE 体系中的反应缓冲 液组成。具体地,我们测试了缓冲液黏度、pH、能量循环与供应,以及缓冲液基 质对 PURE 反应的影响。

值得注意的是,本工作中第一次讨论了核糖体制备方式对 PURE 翻译效率 的影响。PURE 系统中的核糖体采用超速离心-密度梯度离心法进行纯化。该方法 需要专用设备的操作培训,且耗时较长,无法达成连续的,高通量的核糖体纯化。 而 PURE 系统需要大量的核糖体,因而以往核糖体制备的缓慢过程限制了研究 PURE 体外翻译系统的步伐。Capto Core 700 是一种近期新推出的商用树脂,已

被广泛用于病毒纯化领域。我们在本文中证明了 Capto Core 700 可以被用于核糖体的纯化,并且使用该方法纯化的核糖体产物活性较密度梯度离心更高。

此外,本工作还探讨了 20 种氨酰基 tRNA 合成酶(aaRS)在 PURE 体系中的作用和适宜的浓度。通过 aaRS 和翻译因子的协同浓度实验,我们证明了翻译因子相较于 aaRS 对 PURE 的表现更为关键。通过结合我们每一部分的优化,我们将 PURE 系统的翻译效率提升了 332%并证明了其在大蛋白的翻译中能够产生更多全长蛋白而非截短体。

## 二、材料与方法

#### 2.1 材料

#### 2.1.1 菌种与感受态细胞

菌种:

E. coli KC-6,实验室传代。

感受态细胞:

E. coli DH5α感受态细胞,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

E. coli BL21 感受态细胞,实验室自制。

#### 2.1.2 质粒载体

本文所用表达质粒载体均为 pLin-kanR,为实验室自制(图 2.1)。



图 2.1. pLin-KanR 结构示意图

#### 2.2 试剂与仪器

#### 2.2.1 试剂

试剂	来源
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs
dNTP	New England Biolabs
5×Phusion PCR Buffer Mix	New England Biolabs
Hepes	Sangon
KCl	Sangon
MgAc	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sangon
EDTA-Na <sub>2</sub>	Sangon
Isopropanol	Sinopharm
NaOH	Sinopharm
$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich
DEPC	Sangon
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	Sinopharm
КОН	Sinopharm
Glycerol	Sangon
Tris	Sangon
HCl	Sinopharm
NaCl	Sangon
Imidazole	Sangon
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich
Tryptone	ThermoFisher Scientific
Yeast Extract	ThermoFisher Scientific
DNase I	Sigma-Aldrich
Potassium Glutamate	Sigma-Aldrich
Amino Acids (20 types)	Sigma-Aldrich
tRNA	Sigma-Aldrich

表 2.1 本研究所用试剂及其来源汇总

试剂	来源
NTP	Sigma-Aldrich
Creatine Phosphate	Sigma-Aldrich
Formyl Donor	Sigma-Aldrich
Spermidine	Sigma-Aldrich
DTT	Sangon
RNase Inhibitor	New England Biolabs
Kanamycin	Sangon
PBS	Sangon
Coomassie Blue Stain	APExBIO
IPTG	Sangon
Glycine	Sangon
SDS	Sangon
50×TAE	Sangon
Agarose	Sangon
Agar	Sangon
GelRed Nucleic Acid Stain	ShareBio
Trans 2K Plus II DNA Marker	TransGen Biotech
Unstained Protein MW Marker	ThermoFisher Scientific
Prestained Protein MW Marker	ThermoFisher Scientific
10×TBST	Sangon
Non-fat Milk	Sangon
Monoclonal Mouse Anti-FLAG, 1:1000	Sigma-Aldrich
Goat Anti-Mouse IgG, 1:5000	Jackson ImmunoResearch Laboratories
SuperSignal <sup>TM</sup> West Pico PLUS	
Chemiluminescent Substrate	I nermoFisher Scientific

#### 2.2.2 仪器及耗材

仪器与耗材	来源
移液枪	Eppendorf
电动大容量移液器	DLAB Scientific
梯度 PCR 仪	Eppendorf
纯水仪	Pall Corporation
0.20 µM Nylon Membrane	Millipore
0.22 µM RNase-free Filter Unit	Corning
0.22 µM Syringe Filter	Millipore
磁力搅拌器	Corning
高温烘箱	Memmert
高压细胞破碎仪	Union-Biotech
落地式超速离心机	Beckman Coulter
分析天平	Sartorius
HiScreen Capto Core 700 15 mL	Cytiva
AKTA Pure	GE Healthcare
冷冻离心机	Eppendorf
小型高速离心机	Eppendorf
蛋白浓缩离心管	Amicon
Nanodrop 2000	ThermoFisher Scientific
721 分光光度计	上海精密科学仪器有限公司
-80°C 冰箱(立式)	Haier
-80°C 冰箱(卧式)	Haier
-30°C 冰箱	Haier
4°C 冰箱	Haier
37°C 恒温摇床	上海知楚仪器有限公司
37°C 恒温培养箱	Memmert
HisTrap HP 5 mL	Cytiva
HiLoad 26/600 Superdex 200 pg	Cytiva

表 2.2 本研究所用仪器、耗材及其来源汇总

仪器与耗材	来源
电子 pH 计	Sartorius
96 孔细胞培养板	Corning
酶标仪	Bio-Rad
多功能凝胶成像分析系统	Bio-Rad
核酸电泳仪	Bio-Rad
蛋白电泳仪	Bio-Rad
转膜仪	Bio-Rad
常温摇床	Corning
金属浴	Corning
<b>PVDF</b> 薄膜	GE Healthcare

#### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 细胞培养

配置 LB 液体培养基: 10g Tryptone, 5g Yeast Extract, 10g NaCl, 加 ddH2O 定容至 1000 mL 后分装灭菌。灭菌条件: 121°C, 高压蒸汽, 20 min

配置 LB 固体平板: 10g Tryptone, 5g Yeast Extract, 10g NaCl, 15g Agar, 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000 mL 后分装灭菌。待灭菌结束冷却至 50°C 左右时加入目标 抗生素(1:1000)并分装至平板培养皿(15 mL/皿)。

取待培养菌种划线接种于目标抗性的 LB 固体平板中,于 37°C 恒温培养过 夜后,挑取形态完整的单一菌落,接种于 5 mL 目标抗性的 LB 液体培养基中,于 37°C 恒温,220 rpm 震荡培养过夜,待用。

#### 2.3.2 E. coli 70S 核糖体纯化

一、配置下列溶液:

Buffer A: 20 mM Hepes-KOH (pH7.4), 100 mM KCl, 10 mM MgAc, 7 mM
2-Mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>

2. CIP Solution: 1 M NaOH, 30% Isopropanol

3. High-Salt Buffer: 20 mM Hepes-KOH (pH7.4), 100 mM KCl, 10 mM MgAc,

7 mM 2-Mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 1.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

4. Ribosome Buffer: 20 mM Hepes-KOH (pH7.4), 60 mM KCl, 6 mM MgAc,

7 mM 2-Mercaptoethanol

5. DEPC H<sub>2</sub>O: 将 DEPC 以 1:1000 溶解于 ddH<sub>2</sub>O 中,持续搅拌至少 16 小时 后,于 121℃ 高压蒸汽灭菌,灭菌时间为 15 min/L。

二、取 E. coli KC-6 菌株按照 2.3.1 中所述方法培养后,以 1:1000 接种于 4 L LB 培养基,于 37℃ 恒温,220 rpm 震荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.6 时停止培养。

三、所得培养液于室温离心(7800×g, 20 min)后,转移沉淀。将菌沉淀用 Buffer A 重悬溶解后,添加 1:500 的 DNase I,于 4°C,800 PSI 下高压破碎,所 得悬液于 30,000×g,4°C 下离心 60 min,在离心所得上清中添加(NH4)<sub>2</sub>SO4 至 1.5 M 浓度,持续搅拌至少 30 min,所得悬液于 30,000×g,4°C 下离心 60 min,将 离心所得上清通过 0.22 μm 滤膜过滤备用。

四、将 HiScreen Capto Core 700 连接至 AKTA Pure 系统,在上样前,用 2 CV High-Salt Buffer 平衡色谱柱或平衡至所有参数稳定。

五、平衡后,以 2.5 mL/min 的流速上样处理好的样品,同时收集流穿液,并 用 Amicon<sup>®</sup> Ultra 100K 蛋白浓缩离心管,于 4°C 下浓缩至核糖体浓度为 40 μM。 用 SDS-PAGE 电泳检验核糖体纯度(见 2.3.5)。

六、上样完成后,以 2.5 mL/min 的流速用 10 CV High-Salt Buffer 冲洗色谱 柱,同时收集流穿液,处理方式同上一步。

七、将色谱柱反接,用 CIP Solution 以 0.2 mL/min 用 2 CV 清洗色谱柱以去除结合的杂质,并以 2.5 mL/min 用 2 CV DEPC H2O 重生色谱柱。

#### 2.3.3 蛋白质纯化

一、配置下列溶液:

1. His-Buffer A: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 200 mM NaCl, 20 mM Imidazole

2. His-Buffer B: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 200 mM NaCl, 500 mM Imidazole

3. GF Buffer: 50 mM Hepes-KOH (pH7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 在 使用时添加 5 mM 2-Mercaptoethanol

二、取已经含有目标蛋白编码基因序列插入的 pLin-KanR 质粒,转化 E. coli BL21 感受态细胞(10 μg 质粒/100 μL 感受态,冰浴 30 min 后 42°C 热激 45 s, 再冰浴 3 min 后加入 10 倍体积 LB 液体无抗培养基, 37°C 震荡培养 1 h 后离心 取沉淀,平板划线分离)。按照 2.3.1 中所述方法培养后,以 1:1000 接种于 4 L L B 培养基,于 37°C 恒温,220 rpm 震荡培养至 OD600=0.6 时,向培养基中添加 0.5 mM IPTG,于 37°C 恒温,220 rpm 诱导表达 3.5 h。

三、所得培养液于室温离心(7800×g, 20 min)后,转移沉淀。将菌沉淀用 His-Buffer A 重悬溶解后,添加 1:500 的 DNase I 和 RNase I,于 4°C,800 PSI 下 高压破碎,所得悬液于 30,000×g,4°C 下离心 60 min,所得上清通过 0.22 μm 滤 膜过滤备用。

四、连接 HisTrap HP 5 mL 至 AKTA Pure, 以 2.5 mL/min 用 His-Buffer A 平 衡色谱柱至各参数稳定。

五、平衡后,以 2.5 mL/min 的流速上样处理好的样品。样品上样完成后,以 2.5 mL/min 的流速用 His-Buffer A 冲洗色谱柱至各参数稳定。

六、用 20 CV 的 0-100% His-Buffer A 与 His-Buffer B 浓度梯度混合液以 2.5 mL/min 的流速洗脱色谱柱,以每 5 mL 分管单位分离洗脱液。洗脱完成后,根据 A280 峰出现的位置,选择富含目标蛋白的分管用 Amicon<sup>®</sup> Ultra 3K 浓缩至 10 mL 待用。洗脱完成的色谱柱用 His-Buffer A 以 2.5 mL/min 的流速冲洗至各参数 稳定。

七、连接 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg 至 AkTA Pure,以 0.8 mL/min 用 1 CV GF Buffer 平衡。

八、浓缩完成的蛋白样品以 0.8 mL/min 的流速进行上样。上样完成后,用 GF Buffer 以 0.8 mL/min 的流速开始洗脱色谱柱。经过 1 个死水体积后,以每 5 mL 分管单位分离 1 CV 的洗脱液。洗脱完成后,根据 A280 峰出现的位置,选择 富含目标蛋白的分管用 Amicon<sup>®</sup> Ultra 3K 浓缩至蛋白浓度为 200 mg/mL,取样经 SDS-PAGE 电泳检测(见 2.3.5)后,-80°C 保存于含有 30% Glycerol 的 GF Buffer 中。洗脱完成的色谱柱用 GF Buffer 以 0.8 mL/min 的流速冲洗至各参数稳定。

#### 2.3.4 PURE 蛋白质生产与检测

一、配置下列溶液:

1. 2×PURE Buffer A

2.10×PURE Enzymix, 其中所有 aaRS 均预先纯化

3.5×PURE F-Mix,其中所有翻译因子均预先纯化

成分	液度 (mM)	
Hepes-KOH	50 (pH7.6)	
Potassium Glutamate	100	
MgAc	13	
Amino Acids	0.1	
tRNAs (OD <sub>260</sub> /mL)	54	
ATP	2	
CTP	1	
UTP	1	
Creatine Phosphate	20	
Formyl Donor $(\mu g/mL)$	10	
Spermidine	2	
DTT	1	
GTP	2	

表 2.3 2×PURE Buffer A 成分

表 2.4 10×PURE Enzymix 成分

aaRS	浓度(μg/mL)
AlaRS	69
ArgRS	20
AsnRS	22
AspRS	8
CysRS	1.2
GlnRS	3.8
GluRS	12.6
GlyRS	9.6
HisRS	0.8
IleRS	40
LeuRS	4
LysRS	6.4

氨酰基-tRNA 合成酶	浓度(µg/mL)
MetRS	2.1
PheRS	17
ProRS	10
SerRS	1.9
ThrRS	6.3
TrpRS	1.1
TyrRS	0.6
ValRS	1.8

#### 表 2.5 5×PURE F-Mix 成分

翻译因子	浓度(µg/mL)
Methionyl-tRNA Formyltransferase	20
(MTF)	20
IF-1	10
IF-2	40
IF-3	10
EF-G	50
EF-Tu	100
EF-Ts	50
RF-1	10
RF-3	10
Ribosome Recycling Factor (RRF)	10
Creatine Kinase (CK)	4
Myokinase (MK)	3
Nucleotide Diphosphate Kinase	
(NDK)	1.1
Pyrophosphatase (PPase)	1

二、用于 PURE 反应的 DNA 模版制备:

通过 PCR 制备 PURE 所用的模版。在含有目标基因的核酸片段上,以正向

引物 (5'-3'):

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAG AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA-目标基因前 20 个核苷 酸;反向引物 (5'-3'):

GGATTAGTTATTCA-目标基因最后 20 个核苷酸为引物对进行 PCR 扩增, 所得产物取样在 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后经过柱纯化(NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up, MACHEREY-NAGEL),稀释至 50 ng/µL,作为 PURE 的模版。

	ж (м 20 µн) /3//1/
成分	用量 (µL)
2×PURE Buffer A	10
10×PURE Enzymix	2
5×PURE F-Mix	4
RNase Inhibitor (NEB)	0.5
20 µM 70S Ribosome	2
Template(50ng/µL)	1
DEPC H <sub>2</sub> O	0.5
Total	20
于冰上配置该体系。反应条件: 37	7°C,180 min。反应结束立即冰浴

表 2.6 PURE 反应体系(以 20 uL 为例)

三、组装 PURE 反应体系并执行反应

四、检测 PURE 翻译产物。本工作中主要涉及三种模版的翻译和检测: Nanoluc, eGFP 和 $\beta$ -gal。对于 $\beta$ -gal, 我们采取 Western Blot 检测(见 2.3.5), 对 于 eGFP, 在反应结束后,取 10 µL 反应液稀释于 90 µL PBS 中,以 100 µL PBS 作为空白对照,用酶标仪读取荧光强度作为活性 eGFP 产量的表征;对于 NanoLuc, 在反应结束后参照 Promega 公司提供的的 Luciferase Assay System (E1501)表征 活性 Luciferase 产量。

#### 2.3.5 SDS-PAGE 和 Western Blot

一、对于 SDS-PAGE-考马斯亮蓝染色,将翻译产物、核糖体样或蛋白纯化产物 4:1 与 5×上样缓冲液(0.2 M Tris-HCl (pH6.8)、0.4 M DTT, 8%SDS, 40%甘油和 0.4%溴酚蓝)混合,95℃失活 5 min,取每个样品 10-20 μL 上样至 15%无梯度 SDS-PAGE 凝胶,150 V 电泳 60 min 后,对凝胶用免脱色考马斯亮蓝

(APExBIO)进行染色过夜,直到蛋白条带清晰可见为止。

二、对于 Western Blot, 将凝胶于 1×Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo Transfer Buffer (Bio-Rad)溶液, 在 Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo Transfer System (Bio-Rad)中以 25 V, 1.3 A, 10 min 转至 PVDF 膜 (GE Healthcare),将转膜完成的 PVDF 膜于 TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶中于室温温和地震荡 1h。用 TBST 清洗 3 次后,于 4℃ 孵育 Mouse Anti-FLAG 或 Mouse Anti-eGFP 过夜。随后,用 TBST 清洗 3 次,室温温和震荡孵育 Anti-Mouse 1 h,再用 TBST 清洗 3 次后,将 PVDF 膜覆盖于 SuperSignal<sup>TM</sup> West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific)中 30 s,用 ddH<sub>2</sub>O 漂洗以终止反应。

### 三、研究结果

#### 3.1 Capto Core 700 可用于 PURE 核糖体的有效纯化

Capto Core 700 作为一种新推出的市售树脂,已经开始被用于病毒纯化领域 <sup>[10][12]</sup>,但尚未被应用于核糖体纯化。鉴于其声称可以"吸附并清除细胞裂解液中 所有小于 700 kDa 的蛋白复合物",我们认为 Capto Core 700 可以代替传统的蔗 糖密度梯度离心来纯化细菌核糖体。为了验证基于 Capto Core 700 树脂的多模亲 和层析是否能用于核糖体纯化,我们将用于收获核糖体的大肠杆菌 KC-6 菌株培 养液分为两份,对其中的一份采用传统的蔗糖密度梯度离心法进行纯化,对另一 份使用 Capto Core 700 色谱纯化(图 3.1.A)。4L 大肠杆菌 KC-6 菌株于 37°C 生 长至 OD=0.6 状态下进行收获,将离心沉淀的细胞在 15,000 PSI 下破碎,并于 30,000×g 下离心,去除细胞碎片沉淀,将所得上清通过 0.22 μm 滤膜过滤,分为 两份。第一份被置于 0.5-0.7 M 蔗糖溶液构成的浓度梯度中,于 100,000×g 下离 心,所得核糖体粗沉淀经过溶解后再通过 15%-40%的解离缓冲液以 100,000×g 离心,分离出 30S 和 50S 核糖体亚单位,合并后作为 PURE 所使用的核糖体。 第二份在经过 1.5 M 硫酸铵沉淀后,于 30,000×g 下离心,所得上清使用 AKTA Pure 液相色谱系统通过 Capto Core 700 色谱柱纯化。

与预期一致, 蔗糖密度梯度离心产出了高质量的核糖体 (图 3.1.B 右)。通过 考马斯亮蓝染色可以清晰地分辨核糖体的主要结构, 尤其是核糖体 S1 亚基清晰 地从细胞裂解液中分离了出来。在产量方面,密度梯度离心允许从每升 OD<sub>600</sub>=0.6 的大肠杆菌 KC-6 培养液中纯化出 380 mg 的核糖体。

使用 Capto Core 700 纯化的核糖体与蔗糖密度梯度离心所得的核糖体的 SDS-PAGE 凝胶电泳检验结果显示两者之间纯度相当(图 3.1.B)。在产量方面, Capto Core 700 可以从每升培养液中纯化总量 192 mg 的核糖体。尽管在色谱纯 化时,核糖体浓度可能被稀释,但后续的超滤浓缩过程中,核糖体的损失有限。 我们认为, Capto Core 700-超滤或可成为核糖体纯化的一种新方法。



图 3.1. 核糖体通过 Capto Core 700 或传统密度梯度离心纯化方法与结果比较 A: 两种纯化方法的流程图。在传统方法中,由于牵涉到两次蔗糖密度梯度离心, 整体耗时超过 5 天,而借用 Capto Core 700 进行纯化可将时间缩短至一天内; B: 考马斯亮蓝染色比较通过 Capto Core 700 纯化的核糖体 (左) 与通过蔗糖密度梯度 离心纯化的核糖体(右); (NH4)2SO4: 对细胞裂解液进行 1.5 M (NH4)2SO4 沉淀处 理后, 15,000×g 离心 30 min, 所得沉淀为 P 泳道, 上清为 S 泳道; Core 700: 使 用 Capto Core 700 对(NH4)2SO4 沉淀处理后上清液进行色谱纯化。泳道 1-4 分别代 表从上样起开始按顺序收集的 4×50 ml 流穿液样本。黄色箭头指示核糖体富集的 流穿液样本; 15,000 S: 细胞裂解液于 15,000×g 离心 60 min 所得上清; 100,000 SI: 15,000 S于 100,000×g 离心 30 min 所得上清; 100,000 PI: 15,000 S于 100,000×g 离心 30 min 所得沉淀; 100,000 SII: 100,000 SI 在 0.5-0.7 M 浓度梯度蔗糖溶液中 于 100,000×g 离心 16 h 所得上清; 100,000 P Gel-Like: 100,000 SI 在 0.5-0.7 M 浓 度梯度蔗糖溶液中于 100,000×g 离心 16h 所得沉淀中的胶状核糖体; 100,000 PII: 100,000 SI 在 0.5-0.7 M 浓度梯度蔗糖溶液中于 100,000×g 离心 16 h 所得沉淀; 50S Subunit: 通过进一步密度梯度解离的核糖体 50S 亚基; Mid: 在解离核糖体 50S 和 30S 亚基的密度梯度离心中位于 50S 和 30S 两层之间的样本; 30S Subunit: 通过 进一步密度梯度解离的核糖体 30S 亚基: 70S Mixture: 将 50S Subunit 和 30S Subunit 混合后的 70S 完整核糖体

#### 3.2 批量补充 PURE 所含的翻译相关因子及核糖体来改善翻译效率

PURE 系统的必要组分包含 IF-1, IF-2, IF-3, EF-G, EF-Tu, EF-Ts, RF-1, RF-3, RRF, 20 种氨酰基 tRNA 合成酶 (aaRS), 甲硫酰基-tRNA 转移酶 (MTF), T7 RNA 聚合酶,核糖体,46 种 tRNA, NTP,磷酸肌酸,四氢叶酸,20 种氨基酸,肌酸激酶,肌激酶,核苷二磷酸激酶和焦磷酸酶<sup>[5]</sup>。在 PURE 系统中,转录和翻译是偶联进行的。因此,为了检验各个状态下 PURE 系统的活性/蛋白生产效率,我们使用 T7 启动子控制下的 eGFP 片段/Nanoluc 荧光素酶片段进行测定。 一般地,对 eGFP 来说,反应在 37°C 下进行三个小时,随后对反应产物进行 1:10 的稀释,并通过酶标仪读取荧光强度,作为产生的功能性 eGFP 的量的表征。而 对于 Nanoluc 荧光素酶,我们在 37°C 下反应三小时后添加 D-Luciferin,显色 180 s 后通过酶标仪读取荧光强度作为功能性 Nanoluc 的产量表征。

aaRS 是 PURE 系统最核心的组成成分之一,任何一种 aaRS 的活性下降或 构象异常都可能直接中断 PURE 翻译的进行。我们首先用 Nanoluc 模版测试了 20 种 aaRS 的加量添加对 PURE 翻译反应的影响。我们先将 20 种 aaRS 按照字 母顺序分类为 5 类,随后在 5 个不同的 PURE 反应中分别使对应的 aaRS 组浓度 达到 50 倍 PURE 原液中的浓度(图 3.2.A)。结果显示包含 AlaRS,ArgRS,AsnRS, AspRS 的组合浓度提升可以显著增强 PURE 的翻译效率(图 3.2.B)。进一步的分 离该组合,我们发现 ArgRS 的浓度提升对翻译效果的贡献最为明显(图 3.2.C) 并用蛋白印迹(WB)验证了这一结果(图 3.2.D)。



图 3.2. 通过添加 20 种氨酰基 tRNA 合成酶(aaRS)来改善PURE 的翻译效率 反应体积 20 µl,反应时间 3 小时;A: aaRS 按字母顺序分为五组,每组包含四种 aaRS;B: 过量添加每组 aaRS 对 PURE 翻译效率的影响(以 Nanoluc 为模版)。检 测时,在添加完 D-Luciferin 后立即用酶标仪进行一次测量,随后在室温静置 3 min 后再次测量。对于 Mix I-Mix V 中的每个 PURE 反应,其中对应的四种 aaRS 浓度 均为经典 PURE 中的 50 倍;P.C.: 经典 PURE 反应; N.C.: 无模版的 PURE 反应; C: 过量添加 Mix I 中的四种 aaRS (50 倍)对 PURE 翻译效率的影响(以 Nanoluc 为模版);D: Anti-eGFP 的 WB 检测过量添加 Mix I 及其中的四种 aaRS (50 倍) 对 PURE 翻译效率的影响(以 eGFP 为模版);eGFP:标准 eGFP 样品;E: 过量 添加剩余 16 种 aaRS (50 倍)对 PURE 翻译效率的影响(以 eGFP 为模版);F: WB 检测过量添加剩余 16 种 aaRS (50 倍)对 PURE 翻译效率的影响(以 eGFP 为模版);F:

除了上述四种 aaRS,我们仍需验证其余的 aaRS 对 PURE 系统的贡献。为此,我们使用了 eGFP 模版对剩余 16种 aaRS 进行了扫描式检测,结果显示 IleRS, PheRS 和 ThrRS 的过量将抑制 PURE 的翻译活性(图 3.2.E),这一结果在随后的 WB 中得到了验证(图 3.2.F)。

除了 aaRS 之外,翻译相关因子是 PURE 系统中的另一核心成分。已有报道 显示三种延伸因子 EF-Tu, EF-Ts 和 EF-G (尤其是 EF-Tu)可能是促进 PURE 翻 译反应进行的关键因子<sup>[13]</sup>。我们在此使用 eGFP 模版,在批量增加了所有翻译因 子之后,发现2倍浓度下的翻译因子可以提升 39%的 PURE 翻译效率(图 3.3.A)。 此外,由于 PURE 系统需要极高浓度的 EF-Tu<sup>[5]</sup>,我们推测 EF-Tu 的不足可能是 制约 PURE 翻译反应的限速步骤。因此,我们尝试在上述 2 倍因子浓度的基础 上,保持 PURE 反应总体积不变的情况下,进一步增添不同浓度的 EF-Tu,结果 显示,尽管提升不明显,但当在添加 21.6 µg EF-Tu 时,PURE 的效率获得了最 高的提升,为14% (图 3.3.B)。



#### 图 3.3. 通过改变翻译因子浓度提高 PURE 的产率

翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 μl,反应时间 3 小时; A:将 PURE 中的所有 翻译因子浓度提升一倍,与未提升的 PURE 系统比较翻译效率; P.C.:未提升翻译 因子浓度的 PURE 系统; 2×Factors:两倍翻译因子浓度的 PURE 系统; B:在两 倍翻译因子浓度的基础上,继续增加 PURE 中 EF-Tu 的浓度,与未提升的 PURE 系统比较翻译效率

尽管 aaRS 和翻译因子均体现出对 PURE 效率明显影响,但目前并不清楚两 者之间的主导地位。结合先前过量添加多数 aaRS 并不能有效提升翻译效率的情 况下,我们猜想 aaRS 的过量可能通过耗竭体系中的能量供给,从而影响翻译的 延伸,而翻译因子则直接参与翻译起始,延伸和终止的过程,因而在体系内可供 翻译的模版量过量的情况下, 增加翻译因子的浓度将有利于反应的持续进行。因 此,我们试图降低了整体 aaRS 的浓度,与此同时在部分实验组中使用了2 倍因 子浓度(这在先前的实验中被证明对 PURE 效率有显著提升)。结果显示 aaRS 的 在降低至 50%, 25%和 12.5% 原浓度的情况下并没有对 PURE 的翻译效率产生明 显影响,在增加一倍翻译因子的浓度之后,降低 aaRS 的浓度依然不产生显著影 响(图 3.4)。依据这一结果,我们最终建议在 PURE 体系中维持的 aaRS 浓度和 各翻译因子浓度分别如表 3.1 和表 3.2 所示。



#### 图 3.4. 整体降低 aaRS 不对 PURE 的翻译效率产生显著影响

翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 µl,反应时间 3 小时; PC: 经典的 PURE 系 统: NC: 缺少模版的 PURE 系统

	衣 3.1	以及后的 PURE 中 aaRS A	X度建议
D.C		经典 PURE 中浓度 <sup>[5]</sup>	<b>北白丘沈府(/…I)</b>
aaKS		$(\mu g/mL)$	改良后浓度(µg/mL)
AlaRS		69	17.25
ArgRS		20	50
AsnRS		22	5.5
AspRS		8	2
CysRS		1.2	0.3
GlnRS		3.8	0.95
GluRS		12.6	3.15

#### - DC かた 庄子寺 パ

aaRS	经典 PURE 中浓度 <sup>[5]</sup>	- み自 丘波 度(ug/mⅠ)
	$(\mu g/mL)$	以民口祇及(µg/mL)
GlyRS	9.6	2.4
HisRS	0.8	0.2
IleRS	40	10
LeuRS	4	1
LysRS	6.4	1.6
MetRS	2.1	0.53
PheRS	17	4.25
ProRS	10	2.5
SerRS	1.9	0.48
ThrRS	6.3	1.58
TrpRS	1.1	0.28
TyrRS	0.6	0.15
ValRS	1.8	0.45

表 3.2	改良后的 PURE 中翻译因子浓度建议

	经典 PURE 中浓度 <sup>[5]</sup>	
Factor	$(\mu g/mL)$	改良后浓度(µg/mL)
Methionyl-tRNA		
Formyltransferase	20	40
(MTF)		
IF-1	10	20
IF-2	40	80
IF-3	10	20
EF-G	50	100
EF-Tu	100	1400
EF-Ts	50	100
RF-1	10	20
RF-3	10	20

Factor	经典 PURE 中浓度 <sup>[5]</sup> (µg/mL)	改良后浓度(µg/mL)
Ribosome Recycling Factor (RRF)	10	20
Creatine Kinase (CK)	4	8
Myokinase (MK)	3	6
Nucleotide Diphosphate Kinase (NDK)	1.1	2.2
Pyrophosphatase (PPase)	1	2

核糖体的纯化策略的不同可能导致核糖体成分的不一致性,从而影响 PURE 的翻译效率。结合我们先前使用 Capto Core 700 进行核糖体纯化的成功的尝试, 我们进一步评估了使用 Capto Core 700 和传统密度梯度离心两种方式纯化的核 糖体活性。我们通过在 PURE 系统中使用两种不同制备方法得到的核糖体,随后 以 eGFP 为模版测试翻译产物信号强度。结果表明经过 Capto Core 700 纯化的核 糖体相比于使用蔗糖密度梯度离心,能够使 PURE 系统获得更高的翻译效率(图 3.5.B),提升为 68%。此外,通过核糖体浓度梯度实验,我们还确定了最佳的 PURE 核糖体浓度为 2 μM (图 3.5.A)。我们认为,基于 Capto Core 700 的尺寸排阻色 谱层析相比于传统的蔗糖密度梯度离心,可以更快速地生产活性更高的核糖体, 且具有达成连续的、高通量生产的潜力<sup>[10]</sup>,是一种既有利于 PURE 的产量,又有 利于 PURE 的生产的新方法。



图 3.5. 核糖体浓度与种类对 PURE 翻译效率的影响

翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 μl,反应时间 3 小时; A:核糖体浓度与活性 eGFP 产量的关系。使用的核糖体为第一轮蔗糖密度梯度离心后的沉淀(详见图 3.1.B 右侧 100,000 PII); B:使用不同纯化方式制备的核糖体对 PURE 翻译效率的

影响; **70S**: 经过完整的蔗糖密度梯度离心法纯化后由 30S 和 50S 亚基组装而成的 70S 核糖体 (详见图 3.1.B 右侧 70S Mixture); **Gel-Like**: 第一轮蔗糖密度梯度离心 后的沉淀中凝胶状核糖体(详见图 3.1.B 右侧 100,000 P Gel-Like); **Capto Core 700**: 使用 Capto Core 700 分子排阻层析纯化获得的核糖体 (详见图 3.1.B 左侧)

此外,由于 PURE 系统是一个转录-翻译偶联体系,转录 RNA 产物的丰度和转录效率也对 PURE 的蛋白产出有一定影响。我们尝试在 PURE 中添加额外的 T7 RNA 聚合酶,结果显示聚合酶的添加对 PURE 存在明显的抑制作用(图 3.6)。



图 3.6. T7 聚合酶的浓度升高将降低 PURE 的翻译效率

翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 µl,反应时间 3 小时。横轴表示 PURE 体系中 T7 RNA 聚合酶的终浓度

#### 3.3 改变 PURE 系统中非蛋白成分来改善翻译效率

在 PURE 系统中,非蛋白成分包括 46 种 tRNA, NTP,磷酸肌酸,四氢叶酸,20 种氨基酸,肌酸激酶,肌激酶,核苷二磷酸激酶和焦磷酸酶<sup>[5]</sup>。这些成分虽然不直接催化蛋白的合成,但已有一些研究表明,pH、缓冲液粘度以及 NTP、 氨基酸的丰度对 PURE 翻译效率存在影响<sup>[11][13]</sup>。在这一部分中,我们尝试了不同的组合:提高反应体系的黏稠度,改变缓冲液 pH 和基质,添加磷酸肌酸等,试图改善 PURE 的翻译效率。

首先,我们尝试通过向 PURE 中添加牛血清白蛋白(BSA)增加体系的黏稠 度。PURE 系统是一个较为稀释的溶液,其中的翻译反应环境无法像细胞中一样 拥挤且含有大量蛋白。添加 BSA 可以补充翻译环境中蛋白浓度。大分子非蛋白 物质,如 PEG-6000,似乎不能有效提升活性蛋白的产量<sup>[14]</sup>,这可能是因为大分 子拥挤促进了蛋白质的聚集,导致新生成的蛋白无法正确折叠。我们的测试表明 在低浓度 (≤12 μM)下,BSA 的添加效果并不明显(图 3.7),随着浓度的提升, PURE 的翻译效率提升在 18.6 μM BSA 下达到最大值 (12%),但仍不显著。



#### 图 3.7. 向 PURE 中添加 BSA 不对其翻译效率产生显著提升 翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 µl,反应时间 3 小时。横轴表示 PURE 翻译体 系中 BSA 的终浓度

进一步的,我们试图改变 PURE 体系中缓冲液离子成分。有先前的研究<sup>[13]</sup> 指出体系中过多的 Mg<sup>2+</sup>将负面地影响 PURE 的翻译效率,但并未指出较低 Mg<sup>2+</sup> 对 PURE 的影响。因此我们决定一方面向 PURE 中添加 MgCl<sub>2</sub>,同时在另一方面 使用 EGTA 中和体系中的 Mg<sup>2+</sup>。与 EDTA 相比,EGTA 在 PURE 系统中是更合 适的,因为其对 Mg<sup>2+</sup>的亲和力较低,因而对 Ca<sup>2+</sup>的选择性较高,可以模拟类似 于活细胞中的低 Ca<sup>2+</sup>高 Mg<sup>2+</sup>的缓冲环境。但在我们的实际测试中,2-8 mM 的 MgCl<sub>2</sub>(图 3.8.A)和 4-12 mM 的 EGTA(图 3.8.B)均显示出对 PURE 蛋白表达 效率的抑制。这表明 PURE 的最适 Mg<sup>2+</sup>浓度为 14 mM。

除了 Mg<sup>2+</sup>,我们继续尝试了其他几种不同的缓冲液配方。有早期的报道指 出在真核体外翻译系统中添加精胺将有助于翻译效率的提升<sup>[15]</sup>,在我们的尝试 中,我们找出了最佳的精胺添加浓度为 0.2 mM (图 3.8.C)。该浓度下,PURE 翻 译效率提升为 46%。磷酸肌酸是 PURE 中主要的能量储备源,磷酸肌酸的含量 不足将导致翻译反应因为没有足够的 ATP 供给而停滞。在我们的尝试中,10 mM 的磷酸肌酸能够提供最大的翻译效率增幅,为 22% (图 3.8.D)。

最后,我们尝试寻找不同缓冲液基质和 PURE 翻译效率之间的关系。经典的 PURE 是基于 Hepes-KOH (pH 7.6)的<sup>[5]</sup>。我们在此尝试了使用 Tris-HCl 来代替 Hepes-KOH,并设置了不同的反应 pH。结果显示将 PURE 置于更碱性的 Hepes-KOH (pH8.0)可以提升 26%的翻译效率,而将 Hepes-KOH 更换为 Tris-HCl 则 没有帮助(图 3.8.E)。综上所述,我们最终优化所得的 PURE 反应缓冲体系成分 如表 3.3 所示。



图 3.8. 测试不同的 PURE 反应缓冲液环境对其翻译效率产生的影响 翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 µl,反应时间 3 小时;A:镁离子的添加对 PURE 翻译效率的影响。横轴表明向 PURE 中增加的 MgCl2 的浓度;B:镁离子的 减少(通过添加 EGTA 络合)对 PURE 翻译效率的影响。横轴表明向 PURE 中增 加的 EGTA 的浓度;C:向 PURE 补充精胺对 PURE 翻译效率的影响。横轴表明 PURE 中增加的精胺的浓度;D:向 PURE 补充磷酸肌酸对 PURE 翻译效率的影响。 横轴表明 PURE 中增加的磷酸肌酸的浓度;E:更换 PURE 缓冲液基质与 pH 对 PURE 翻译效率的影响。横轴表明该 PURE 反应所用的缓冲液基质及其 pH

<b>小</b>	经典 PURE 中浓度 <sup>[5]</sup>	改良后浓度(mM)
成分	(mM)	
Hepes-KOH	50 (pH7.6)	100 (pH7.8)
Potassium Glutamate	100	100
MgAc	13	13
Amino Acids	0.1	0.2
tRNAs (OD260/mL)	54	28
ATP	2	3
СТР	1	1
UTP	1	1
Creatine Phosphate	20	30

表 3.3 改良后的 PURE 反应缓冲液中各成分浓度建议

<b>-</b> 中八	经典 PURE 中浓度 <sup>[5]</sup>	<b>北白</b> 后浓度( <b>m</b> M)
ر <u>کر</u>	(mM)	以及归秋度(mm)
Formyl Donor $(\mu g/mL)$	10	10
Spermidine	2	2
DTT	1	1.5
GTP	2	3

#### 3.4 向 PURE 中添加额外的翻译因子

PURE 所包含的所有组分均为执行原核翻译反应的必须因子,而在细胞中的翻译机器则更为复杂。在这一部分,我们尝试向 PURE 中添加数种于细胞裂解物中存在但在 PURE 中缺乏的翻译相关因子以帮助 PURE 达成更好的表现。

EF-P 在以往的结构和功能研究中表明可以促进蛋白合成过程中第一个肽键 的形成<sup>[16]</sup>。最近的报道显示 EF-P 在多脯氨酸导致的核糖体停滞现象(ribosome stall)中帮助翻译反应继续进行<sup>[17]</sup>。EF-P 通过结合到核糖体的 P 位点和 E 位点 之间,与 P 位点的 tRNA 产生相互作用,以限制 tRNA 的动态迁移,稳定与肽基 转移酶反应兼容的核糖体-tRNA 构象<sup>[17]</sup>。我们的尝试显示出 EF-P 的添加可以使 功能性 eGFP 的产率在反应 3 小时后提升 19%。最佳的 EF-P 浓度为 7 μM (图 3.9.A)。

EF-4 是最近引起关注的另一个翻译辅助因子。最近的结构研究表明, EF-4 可能通过诱导核糖体 A 位点的 tRNA 变形来拯救处于翻译停滞下的核糖体<sup>[18]</sup>。 在先前的报道中, EF-4 也显示出在高 Mg<sup>2+</sup>环境中促进停滞的翻译反应的继续<sup>[19]</sup>。 由于翻译停滞在分子量较大的蛋白中更为常见,我们在这里通过 WB 检测 N-FLAG 标记的β-半乳糖苷酶 (β-gal)的翻译来表征 PURE 系统的截短/停滞翻译 现象。我们的结果显示 PURE 在没有 EF-4 的帮助下时,产生的全长β-gal 较少, 随着 EF-4 的添加量增多,全长β-gal 产量有所增多 (图 3.9.B)。在所有的组中都 观察到了明显的β-gal 截短体,但在较高浓度的 EF-4 组中,截短体的丰度有所降 低 (图 3.9.B)。



#### 图 3.9. 向 PURE 中补充额外的非必须翻译因子

**A:** 向 PURE 中补充 EF-P。翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 μl,反应时间 3 小时。横轴表明向 PURE 中添加的 EF-P 的浓度;**B:** 向 PURE 中补充 EF-4 促进更多 全长蛋白的翻译。翻译模版为 N-FLAG 标记的β-半乳糖苷酶,反应体积 20 μl,反 应时间 3 小时。使用 anti-FLAG 抗体检测全长和截短蛋白翻译情况

#### 3.5 综合评估优化后的 PURE 系统

在之前的部分中,我们通过分析 aaRS,翻译因子,核糖体,以及反应缓冲 液的配方来优化 PURE 系统。通过 eGFP 的翻译实验,我们显示改进后的 PURE 相较于经典的 PURE 系统在活性 eGFP 的产率上提高了 332% (图 3.10)。



#### 图 3.10. 综合优化 PURE 系统前后对比

优化包括: aaRS 和翻译因子浓度调整,缓冲液中 Mg2+浓度、BSA 浓度、磷酸肌 酸浓度、精胺浓度以及 pH 调整,核糖体浓度调整,并向 PURE 中补充 EF-P 和 EF-4。翻译反应模版为 eGFP,反应体积 20 μl,反应时间 3 小时

## 四、讨 论

PURE 系统已经被应用于诸多场合,如核糖体展示和蛋白的定向进化<sup>[20][21]</sup>。同时,PURE 的组分易于控制,因而可以作为研究转录-翻译偶联生化过程的有力工具。此外,PURE 系统在合成生物学中也有极为重要的应用:构建最小重组细胞(自我复制系统)中的翻译机器<sup>[22]</sup>。相比于传统给予大肠杆菌 S30 提取物的CFPS,PURE 不仅减少了体系中的成分的种类,使翻译过程更加易于控制,并允许我们操纵在 PURE 系统中的任意组分。在本工作中,我们尝试通过控制每个PURE 的核心组分来提升 PURE 的蛋白质产量,将 PURE 的翻译效率提升了 3 倍以上。该工作使我们对无细胞翻译系统的工作机制及关键限速步骤的了解进一步加深。

首先我们检查并试图优化 PURE 系统中的核糖体制备方法。由于核糖体的 分子量与原核细胞中其余大分子有显著不同,因而常用超速离心——蔗糖密度梯 度离心法进行纯化<sup>[23]</sup>。经过密度梯度离心后,原核 70S 核糖体可以被解离为 30S 和 50S 亚基。通过解离后再合并,可以清除残留在核糖体内部的核酸片段。通过 密度梯度离心纯化核糖体具有较好的与细胞内杂质分离的效果(图 3.1.B),也具 有较高的核糖体得率。然而,这种经典的纯化方法在 PURE 中并不完全适用。虽 然 PURE 对其中每一个组分均有较高的纯度要求,但经过解离和再组装的核糖 体的翻译活性可能受到影响。Capto Core 700 是一种新型的双层球形树脂微珠, 由惰性的壳和配体活化的内核组成,壳上开孔以允许分子量小于 700kDa 的物质 进入。诸如内毒素、DNA 片段、hsp 等杂蛋白可以进入微珠并通过疏水作用与电 荷相互作用进行结合,而分子量大于 700kDa 的大分子,如核糖体,将无法进入 微珠,从而出现在色谱层析的流穿液中。结合的杂质可以通过 NaOH 轻松洗脱, 实现色谱柱重生。与密度梯度离心相似, Capto Core 700 色谱层析也通过区分不 同分子量的物质实现纯化的目的,然而与之不同的是,Capto Core 700 将 70S 核 糖体作为一整个目标进行纯化,从而确保了核糖体的高活性(图 3.5.B)。此外, Capto Core 700 相比于密度梯度离心还具有显著的时间优势(图 3.1.A)。总之, 我们在本项研究中首先证明了 Capto Core 700 是相比于密度梯度离心更适合 PURE 核糖体制备的方法。

随后我们测试了 20 种 aaRS 与翻译因子的浓度对 PURE 翻译效率的影响。 我们显示,向 PURE 种补充所有翻译因子将有助于 PURE 的产量提升(图 3.3)。 其中较为显著的提升来源于延伸因子 EF-G、EF-Tu 和 RF-Ts。这表明 PURE 的翻 译效率主要受到翻译延伸能力的限制。在三种延伸因子种,EF-Tu 的浓度在 PURE 中达到了惊人的 1400 µg/mL (表 3.2), 这与 EF-Tu 在大肠杆菌内<sup>[24]</sup>, 以及在大 肠杆菌 S30 裂解物中<sup>[25]</sup>的实际丰度相符。在快速生长的大肠杆菌,甚至是其他 大多数原核细胞中, EF-Tu 的浓度可以高达核糖体浓度的 10 倍以上<sup>[24]</sup>。在 PURE 中,核糖体浓度在优化完成后为2 µM(图 3.5.A)。将 PURE 系统中的 EF-Tu 添 加过量可以模拟细胞内的真实翻译环境,防止因 EF-Tu 缺乏而引起核糖体阻滞, 达到更高的蛋白质合成效率。令人好奇的是,尽管 ArgRS 的过量添加可以促进 PURE 的翻译效率, IleRS、PheRS 和 ThrRS 的添加则抑制了翻译反应的进行(图 3.1)。对于 ArgRS, 我们推测其纯化完成时所携带的 N 端 8×His 标签可能在空 间上阻碍了 ArgRS 与 tRNA 的结合,导致其活性低下; IleRS 存在偶然容纳并处 理 Val 的风险<sup>[26]</sup>,因而在 PURE 中浓度过高时会导致 Val 与错误的 tRNA 连接, 致使 Val 的耗竭,影响翻译延伸;对 PheRS 来说,我们推测其可能通过络合 Mg<sup>2+</sup> 影响 PURE 的翻译。尽管所有的氨酰基-tRNA 合成都需要 Mg<sup>2+</sup>的参与,但 Mg<sup>2+</sup> 往往不直接结合 aaRS<sup>[27]</sup>。然而, PheRS 中存在一个 Mg<sup>2+</sup>结合位点, 这可能使 PheRS 在浓度过高的情况下耗竭 PURE 体系中的 Mg<sup>2+</sup>,导致氨酰基-tRNA 的合 成阻滞; ThrRS 本身就是一种翻译抑制蛋白, 在高浓度下, 其通过阻止 30S 核糖 体与 mRNA 的结合抑制翻译的起始<sup>[28]</sup>。进一步地,为了探究 aaRS 和翻译因子 中何种成分是 PURE 的限速因子,我们试图降低了 aaRS 的整体浓度,并显示出 aaRS 浓度的降低并不影响 PURE 的整体翻译效率(图 3.4),说明翻译因子所影 响的翻译起始,延伸和终止相比于氨酰基-tRNA 的合成对 PURE 的蛋白合成效 率有更显著的影响。

在试图探究模版量与 PURE 翻译效率关系时,我们发现当 PURE 中存在更 多 mRNA 模版时(向体系中补充 T7 RNA 聚合酶),PURE 的翻译效率将明显地 降低(图 3.6)。这是一个有趣但并非不合理的现象。我们推测,一方面,过多的 转录反应会消耗 PURE 系统的供能,使转录-翻译的能量分配平衡被打破<sup>[29]</sup>。而 另一方面,过量的 mRNA 可能结合并耗竭 PURE 中的核糖体,而由于此时翻译

因子的相对缺乏,仅部分核糖体-mRNA 复合物得以延伸,游离核糖体的减少导致 PURE 系统中的多数翻译机器处于停滞状态,从而降低 PURE 的翻译效率。

添加 BSA 并不导致 PURE 效率的显著提升是一个预料之外的结果。BSA 在 PURE 中被用作促进拥挤的惰性蛋白。在活细胞内,转录和翻译过程发生在较拥 挤的大分子环境中。先前的研究表明,大分子拥挤效应可以提高酶和底物的有效 浓度<sup>[30]</sup>,并改变催化反应的平衡常数<sup>[31]</sup>。在 DNA 的复制<sup>[32]</sup>和转录<sup>[14]</sup>中,大分子 拥挤效应也可以提升反应的效率。我们认为,BSA 没有在我们的测试中体现出 增强 PURE 效率的原因可能是其浓度仍不够引起大分子拥挤效应,然限于时间, 我们并没有进行进一步提高 BSA 浓度的验证工作。

PURE 的反应缓冲液中,对其活性影响重大的因素包括 Mg<sup>2+</sup>,能量循环和缓 冲液基质。我们的结果显示 Mg<sup>2+</sup>在 PURE 中的浓度必须严格保持 14 mM(图 3.8.A、图 3.8.B)。当 Mg<sup>2+</sup>不足时,络合 Mg<sup>2+</sup>的游离磷酸基下降,这会导致 GTP 和 ATP 合成短缺,直接影响翻译反应的进行<sup>[29]</sup>;而当 Mg<sup>2+</sup>过量时,核糖体则可 能在转位的步骤中停滞<sup>[33]</sup>。在我们的尝试中,在 14 mM 的基础上升高或降低 4 mM 的 Mg<sup>2+</sup>浓度都会导致至少 30%的产率损失,足以见得 PURE 对 Mg<sup>2+</sup>浓度的 敏感。在 PURE 缓冲液优化中另一个值得注意的现象是使用 Hepes-KOH 作为缓 冲液基质相比于 Tris-HCl 具有显著优势(图 3.8.E),这与先前报道中 PURE 系统 更加偏好 K<sup>+</sup>的特性保持一致<sup>[34]</sup>。

最后,我们报道了向 PURE 中补充 EF-P 和 EF-4 对其效率的提升作用。对 于 EF-P 来说,我们的结果并没有显示出显著的活性提升(图 3.9.A)。这是可以 理解的,因为 EF-P 的主要作用在于缓解连续多脯氨酸(Pro)导致的翻译停滞<sup>[17]</sup>, 而 eGFP 中至多存在两个连续的 Pro 序列,因而 EF-P 对 eGFP 的翻译提升效果 可能并不显著。对于 EF-4 而言,我们的结果显示其可以有效改善 PURE 系统翻 译大蛋白(此处为β-gal)时出现截短蛋白的水平(图 3.9.B)。结合先前的报道中 EF-4 可以在高 Mg<sup>2+</sup>的状态下拯救 PURE 反应<sup>[33]</sup>,我们认为向 PURE 中添加 EF-4 可以有效地确保 PURE 在更复杂的条件下执行较大复杂蛋白的翻译。

尽管通过组分浓度优化与模拟活细胞环境进行 PURE 的改进已经使 PURE 的翻译效率获得了巨大提升,但仍有一些参数存在进一步优化的空间。例如,肽 酰 tRNA 水解酶 (PTH)可以通过加速非全长肽链的降解更快地使核糖体循环,

提高核糖体利用效率,并执行蛋白合成的质量控制<sup>[35]</sup>。另外,PURE 系统仅包含 核糖体释放因子中的 RF-1 和 RF-3,所以 RF-2 的添加对 PURE 系统是否会产生 效率或是普适性上的影响还有待观察。我们注意到,分子伴侣系统在 PURE 中的 作用也在先前的报道中结果并不完全一致<sup>[11][13]</sup>,因此也需要进一步定量验证。最 后,还需要指出的是,CFPS 的翻译效率受到能量循环链中的反应副产物的抑制 <sup>[36]</sup>,可以考虑通过补充新鲜的 PURE 反应液缓解该问题。

总而言之,经过我们改进的 PURE 系统相较于经典 PURE,其翻译活性已经 提高至 3 倍以上。我们的工作使 PURE 在单位体积的反应中具有更好的成本效 益,并通过较为全面的分析为制约 PURE 翻译反应的核心因素提供了独特的见 解。由于现阶段国内仍处于体外重组翻译系统研究的起步阶段,本研究将极大推 进国内相关领域的进步。最后,重组型体外翻译系统的高效蛋白表达也为合成生 物学领域的最小重组细胞提供了强有力的工具<sup>[37]</sup>。

参考文献

- 1. N. E. Gregorio, M. Z. Levine and J. P. Oza. A User's Guide to Cell-Free Protein Synthesis[J]. *Methods and Protocols*, 2019, 2.
- M. C. Ganoza, C. Cunningham and R. M. Green. Isolation and point of action of a factor from Escherichia coli required to reconstruct translation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985, 82: 1648.
- Y. Chemla, E. Ozer, M. Shaferman, B. Zaad, R. Dandela and L. Alfonta. Simplified methodology for a modular and genetically expanded protein synthesis in cell-free systems[J]. *Synthetic and systems biotechnology*, 2019, 4: 189-196.
- 4. B. Lavickova and S. J. Maerkl. A Simple, Robust, and Low-Cost Method To Produce the PURE Cell-Free System[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8: 455-462.
- Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 751-755.
- O. Hiroyuki, K. Takashi, S. Yoshihiro and U. Takuya. A Highly Controllable Reconstituted Cell-Free System -a Breakthrough in Protein Synthesis Research[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11: 267-271.
- E. Osada, Y. Shimizu, B. K. Akbar, T. Kanamori and T. Ueda. Epitope Mapping Using Ribosome Display in a Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis System[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2009, 145: 693-700.
- M. C. Jewett and J. R. Swartz. Rapid Expression and Purification of 100 nmol Quantities of Active Protein Using Cell-Free Protein Synthesis[J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20: 102-109.
- M. Y. Pavlov, D. V. Freistroffer, V. Heurgué-Hamard, R. H. Buckingham and M. Ehrenberg. Release factor RF3 abolishes competition between release factor RF1 and ribosome recycling factor (RRF) for a ribosome binding site11Edited by D. E. Draper[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 273: 389-401.
- F. Zhang, J. Luo, M. Teng, G. Xing, J. Guo and Y. Zhang. Purification of cellderived Japanese encephalitis virus by dual-mode chromatography[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, n/a.
- 11. J. Li, L. Gu, J. Aach and G. M. Church. Improved Cell-Free RNA and Protein Synthesis System[J]. *PLOS ONE*, 2014, 9: e106232.
- K. T. James, B. Cooney, K. Agopsowicz, M. A. Trevors, A. Mohamed, D. Stoltz, et al. Novel High-throughput Approach for Purification of Infectious Virions[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36826.
- J. Li, C. Zhang, P. Huang, E. Kuru, E. T. C. Forster-Benson, T. Li, et al. Dissecting limiting factors of the Protein synthesis Using Recombinant Elements (PURE) system[J]. *Translation*, 2017, 5: e1327006.
- 14. X. Ge, D. Luo and J. Xu. Cell-Free Protein Expression under Macromolecular Crowding Conditions[J]. *PLOS ONE*, 2011, 6: e28707.
- 15. A. C. Ferreras, E. Bandeira, E. Cayama, R. Zambrano, H. Avila, A. Yépez, et al. Efficient and faithful in vitro translation of natural and synthetic mRNA with human

ribosomes[J]. Int J Mol Med, 2004, 13: 527-536.

- 16. G. Blaha, R. E. Stanley and T. A. Steitz. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2009, 325: 966-970.
- P. Huter, S. Arenz, L. V. Bock, M. Graf, J. O. Frister, A. Heuer, et al. Structural Basis for Polyproline-Mediated Ribosome Stalling and Rescue by the Translation Elongation Factor EF-P[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68: 515-527.e6.
- M. G. Gagnon, J. Lin and T. A. Steitz. Elongation factor 4 remodels the A-site tRNA on the ribosome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113: 4994-4999.
- M. Pech, Z. Karim, H. Yamamoto, M. Kitakawa, Y. Qin and K. H. Nierhaus. Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg2+ concentrations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 3199-3203.
- 20. D. Lipovsek and A. Plückthun. In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 290: 51-67.
- 21. H. Ohashi, T. Kanamori, E. Osada, B. K. Akbar and T. Ueda. Ribosome Display and Related Technologies: Methods and Protocols[M]. New York, NY: Springer New York, 2012
- 22. A. C. Forster and G. M. Church. Towards synthesis of a minimal cell[J]. *Molecular* systems biology, 2006, 2: 45-45.
- 23. M. C. Rivera, B. Maguire and J. A. Lake. Purification of 70S ribosomes[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015, 2015: 300-2.
- 24. A. V. Furano. Content of elongation factor Tu in Escherichia coli[J]. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, 1975, 72: 4780.
- 25. D. Garenne, C. L. Beisel and V. Noireaux. Characterization of the all-E. coli transcription-translation system myTXTL by mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2019, 33: 1036-1048.
- 26. A. R. Fersht. Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase[J]. *Biochemistry*, 1977, 16: 1025-30.
- 27. R. K. Airas. Magnesium dependence of the measured equilibrium constants of aminoacyl-tRNA synthetases[J]. *Biophysical Chemistry*, 2007, 131: 29-35.
- 28. A. Torres-Larios, A. C. Dock-Bregeon, P. Romby, B. Rees, R. Sankaranarayanan, J. Caillet, et al. Structural basis of translational control by Escherichia coli threonyl tRNA synthetase[J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9: 343-7.
- 29. J. Müller, M. Siemann-Herzberg and R. Takors. Modeling Cell-Free Protein Synthesis Systems-Approaches and Applications[J]. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2020, 8: 584178-584178.
- S. R. McGuffee and A. H. Elcock. Diffusion, Crowding & Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm[J]. *PLOS Computational Biology*, 2010, 6: e1000694.
- A. P. Minton. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media \*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 10577-10580.

- 32. S. B. Zimmerman and B. Harrison. Macromolecular crowding increases binding of DNA polymerase to DNA: an adaptive effect[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84: 1871.
- 33. Y. Qin, N. Polacek, O. Vesper, E. Staub, E. Einfeldt, D. N. Wilson, et al. The Highly Conserved LepA Is a Ribosomal Elongation Factor that Back-Translocates the Ribosome[J]. *Cell*, 2006, 127: 721-733.
- 34. Y. Shimizu, T. Kanamori and T. Ueda. Protein synthesis by pure translation systems[J]. *Methods*, 2005, 36: 299-304.
- 35. S. Sharma, S. Kaushik, M. Sinha, G. S. Kushwaha, A. Singh, J. Sikarwar, et al. Structural and functional insights into peptidyl-tRNA hydrolase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844: 1279-88.
- 36. M. B. Iskakova, W. Szaflarski, M. Dreyfus, J. Remme and K. H. Nierhaus. Troubleshooting coupled in vitro transcription–translation system derived from Escherichia coli cells: synthesis of high-yield fully active proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: e135-e135.
- 37. H. Jia, M. Heymann, F. Bernhard, P. Schwille and L. Kai. Cell-free protein synthesis in micro compartments: building a minimal cell from biobricks[J]. *New Biotechnology*, 2017, 39: 199-205.

### 致谢

四年复旦大学的教育已将我从一个仅仅对生命科学抱有美好憧憬与幻想的 孩童转变为了对生命科学富有热情,期待今后进行科研工作的一位学子。四年的 时间中,许多老师与同学在此过程中曾向我伸出援手,在此表示感谢:

首先要感谢的是在 2019 iGEM 比赛中与我并肩战斗的共同队长胡建一以及 勤奋的组员们。iGEM 是我本科阶段第一次接触自主科研,在第一个自主科研项 目中就担任队长,自然不免会出现诸多疏漏,而正是组员们的信任与批评,才能 使我的科研能力得到一个较好的起步。在此还要感谢给予我们全队大力支持的丁 晓明老师、梁俊恒师兄与王慧敏师姐以及丁晓明实验室的其他成员。iGEM 是我 第一次接触科研实验室的分子实验。梁师兄和王师姐几乎手把手教会了我如何在 实验室展开工作。在他们的帮助下,我第一次独立构建了一个有功能的质粒。这 种从 0 到 1 的突破所带来的喜悦是令我难以忘却的。在这里还要感谢在 iGEM 期 间不断向我们团队提供帮助的杜蓉蓉学姐,你用丰富的知识与经验帮助我们全队 度过了项目开始时最艰难的三个月。

我的本科第二段科研经历始于林金钟实验室。在此感谢林金钟老师,于朝丽 师姐、逯国亮师兄以及林金钟实验室的其他成员。在本研究的进行过程中,林金 钟实验室提供了莫大的支持。林老师在过去的一年中,不论是在我的科研工作上 还是人生规划中都给予了莫大的帮助,与林老师的聊天对我来说总是收获满满。 对于我来说,林老师不仅是在科研方面的导师,更是对我人生和未来规划产生重 大影响的人生导师,为此我想感谢林老师在培养我这样的本科生上所倾注的精力 和心血。于师姐和逯师兄在忙于自己的课题的同时,依然在我身上花费了许多精 力,对我的实验规范进行指导,并教会了我许多新的实验技术,于此同时还不厌 其烦地回答我的各种疑问。正是因为有了师兄师姐不厌其烦的解答,帮助和支持, 我才能让自己的科研水平更进一步。

此外,还要感谢与我一起生活三年的室友胡建一、李昱昶和乔艺。三位高水 平、取奖学金如探囊取物的室友充分激发了我的学习潜能。与此同时,三位室友 给寝室带来的欢乐也是一段值得珍藏的回忆。

在本文的研究过程中,还受到了来自中科院北京生物物理所的王胜博士与王

殊睿技术员的关键帮助,两位在实验上的协助极大加速了本研究进行的步伐。

最后,感谢复旦大学生命科学学院对本科生科研项目的支持,正因为有了诸 如望道、曦源项目等优秀的本科生科研支持计划,才能让希望将来从事科研方向 的学生尽早开始熟悉相关的知识与技术,为将来的职业生涯早作规划。