

麦胚无细胞蛋白合成系统研究进展

刘永祥,陈思远,张逸婧,曹小舟,陈海娟,沈新春*

(南京财经大学食品科学与工程学院/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心
/江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室,南京 210023)

摘要:小麦胚芽作为面粉加工过程中的副产物,具有很高的生物活性,其中包含许多蛋白质合成必需的活性成分,如蛋白质合成场所、蛋白因子及其他相关酶系等。本文综述了在后基因组时代,随着生物技术的发展,以小麦胚芽为原料的无细胞蛋白合成系统在结构蛋白、毒性蛋白和功能蛋白表达方面的优势,阐述了其在蛋白质组学研究和生物制药等领域的重要应用潜力,以期小麦胚芽的深层次开发利用提供了重要依据。

关键词:小麦胚芽,蛋白合成因子,麦胚无细胞蛋白合成系统,深度加工

Research progress in wheat germ cell-free protein synthesis system

LIU Yong-xiang, CHEN Si-yuan, ZHANG Yi-jing, CAO Xiao-zhou, CHEN Hai-juan, SHEN Xin-chun*

(College of Food Science and Engineering/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/Key Laboratory of Grains and Oils Quality Control and Processing,
Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this paper, Wheat germ, a by-product of flour milling, possesses high bio-active and multiple functional compositions, such as the translational apparatus, translation factors and enzymes, which are essential for protein synthesis. With the development of biotechnology in the post genome era, the advantages of wheat germ cell-free protein synthesis system were showed in the expression of structural, toxic and functional proteins. This system was widely applied in proteomics research and the biopharmaceutical field, which provide strong evidence for the importance of developing derived products of wheat germ.

Key words: wheat germ; translation factors; wheat germ cell-free synthesis system; development of derived products

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)17-0379-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.17.070

我国是一个小麦种植大国,小麦胚芽是小麦面粉加工厂的一种副产品,资源非常丰富,每年可用于开发的量达30~50万吨^[1],可是长期以来,绝大多数面粉厂只是把小麦胚芽加入到麸皮中作动物饲料使用,使得这一宝贵资源得不到充分、合理的利用。小麦胚芽约占小麦籽粒的2%~3%,是整个麦粒营养价值最高的部分,含有极其丰富且优质的蛋白质、脂肪、多种维生素、矿物质及一些微量生理活性成分,被营养学家誉为“人类天然的营养宝库”^[2]。小麦胚芽有效成分提取主要集中在小麦胚芽油的提取,小麦胚芽油因富含维生素E及一些脂溶性色素,已被证明具有很强的抗氧化性^[3]。提油后的剩余物即脱脂小麦胚芽含有大量的优质蛋白质、多糖、B族维生素、谷胱甘肽等一些生理活性物质,目前这些物质也正在被进一步开发^[4-6],其中谷胱甘肽作为功能因子在保健食品中的作用正引起广泛关注。据报道,已

有人申请并获得了酿造高谷胱甘肽含量的抗癌系列啤酒的专利,该抗癌系列饮料有防止癌细胞扩散的医疗效果,对食道癌、膀胱癌等都有特殊疗效^[7],这为小麦胚芽的开发利用提供了更多可能。

近年来,随着生物技术的迅速发展,无细胞蛋白表达系统再次得到关注,并作为一种重要的生物技术未来将在生物基础、药物、食品研究领域发挥至关重要的作用。麦胚无细胞蛋白合成系统是其中最重要的合成系统之一,它的深入研究和广泛使用不仅对蛋白质组学有重大研究意义,而且能显著提高小麦胚芽的利用率和经济价值。本文将对以小麦胚芽为原料的体外无细胞蛋白合成系统在后基因组时代研究中的应用进行系统的综述,小麦胚芽的深层次开发利用提供理论依据。

1 无细胞蛋白合成系统

收稿日期:2015-01-28

作者简介:刘永祥(1991-),男,硕士研究生,研究方向:农产品深加工与副产品综合利用,E-mail:15298352190@163.com。

*通讯作者:沈新春(1966-),男,博士,教授,研究方向:农产品深加工与副产品综合利用、分子营养,E-mail:shenxinchun@njue.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(31271983);江苏省自然科学基金(BK20141484);高校2014年度江苏省第四期“333工程”资助科研项目。

随着人类基因组计划完成,后基因组时代正式来临。后基因组学又称功能基因组学,它利用结构基因组学提供的信息和产物,发展利用新的实验手段,通过在基因组和系统水平上全面分析基因的功能,使得生物学研究从对单一基因或蛋白质的研究转向多个基因或蛋白质同时进行系统的研究。因此,在后基因组时代,基因信息成为有用的知识是建立在对基因产物结构和功能的理解上的,而蛋白质生产的局限性仍然是后基因组研究中的一个瓶颈。无细胞蛋白合成系统作为一种新的蛋白合成方法已经引起广泛关注。无细胞蛋白合成系统在近几十年来作为了解转录和翻译的一种基础性研究工具,它以外源 DNA 或 mRNA 为模板,利用细胞抽提物中的蛋白质合成场所、蛋白因子、辅助因子及其他相关酶系,通过添加氨基酸、T7 聚合酶和能量再生物质等来实现蛋白表达的体外系统^[8]。1958 年,Zamecnik^[9]首次证明,从细胞抽提物中获得的翻译机器可以介导体外的蛋白质合成;1961 年,Nirenberg 和 Matthaei^[10]利用蛋白质的无细胞合体系成功翻译一组遗传密码子。与细胞表达系统相比,无细胞表达系统的优点在于:表达蛋白质快速、准确;可合成有细胞毒性、低丰度及含非天然氨基酸等形式的蛋白质;可实现蛋白质表达的实时控制;突破了细胞的限制,利于高通量表达及自动化操作^[11]。鉴于这些优点,无细胞蛋白合成系统已在功能基因组学和结构生物学的蛋白质合成、个性化药物的生产及病毒样颗粒的表达中得到应用^[12];无细胞蛋白合成系统还非常适合用于蛋白质芯片的研制^[13-15]。更令人瞩目的是,近年来在采用连续式的无细胞蛋白合成系统后,每升的反应体系内蛋白质的产量已经达到克级,并能维持几十小时,而它的最大反应规模甚至达到了一百升的里程碑,其中大肠杆菌无细胞蛋白合成系统 24 h 可以合成蛋白质约 1.7 mg/mL^[16-17]。因此,无细胞蛋白合成系统不仅将成为大规模蛋白质合成的工具,而且作为一种创新的工业生产方法在蛋白质生产方面必将被广泛应用。

目前,已经开发出来的无细胞蛋白表达系统有原核和真核系统两种类型。原核系统通常是通过大肠杆菌或其他敲除了内源蛋白酶和核酸水解酶的菌种,如 A19 来进行无细胞表达体系的建立;真核系统,目前比较成熟的是利用兔网织红细胞裂解物(Rabbit Reticulocyte Lysate, RRL)和小麦胚芽抽提物来实现无细胞蛋白表达系统的建立^[17]。小麦胚芽抽提物由于低的内源性的 mRNA,不需 RNA 酶处理,与兔网织红细胞裂解物相比具有资源丰富、来源简单等无可比拟的优点。

2 小麦胚芽无细胞蛋白合成系统研究进展

对于小麦胚芽传统的开发利用与研究,主要体现在以下三个方面:一是小麦胚芽的前处理,如利用心磨系统提取高纯度小麦胚芽^[1]、采用微波进行小麦胚芽的在线稳定化处理^[18]等;二是小麦胚芽功能性成分的提取,例如亚临界流体萃取富含维生素 E 的小麦胚芽油、麦胚色素、二十八醇、谷胱甘肽等^[19];

三是小麦胚芽的生物转化,如通过酵母菌、乳酸菌发酵得到的小麦胚芽提取物制备成具有抗肿瘤、抗氧化等作用的功能性食品^[20],但其机制有待于进一步的研究。随着生物技术的快速发展,对传统意义上的农产品开发利用提出了新的理念和要求,将小麦胚芽加以深层次开发利用,形成具有高附加值的生物新材料(原料)越来越受到人们的重视。由于小麦胚芽中含有丰富的生物活性物质和活性极高的蛋白合成因子、辅助因子及其他相关酶系,因此,利用生物技术已建立了以小麦胚芽为原料的无细胞蛋白合成系统。目前,该系统在蛋白质组学研究中的优势逐渐显现,在生物及制药等领域的应用也越来越受到人们的重视。

2.1 小麦胚芽无细胞蛋白合成系统的优势

小麦胚芽无细胞蛋白合成系统作为体外蛋白合成中的一种重要的方法,与大肠杆菌无细胞蛋白合成系统相比,更适宜用于真核基因表达,能高效生产复杂的真核多结构域蛋白质。与细胞表达系统相比,克服了几乎所有的局限性,如细胞毒性、难于纯化、不能合成含有非天然氨基酸的蛋白质和难于实现高通量的蛋白质表达等^[21],且可以通过简单调整以便适于不同温度下的蛋白质生产^[22]。因此,麦胚无细胞蛋白合成系统明显优于细胞表达系统和大肠杆菌等无细胞蛋白合成系统。然而,在无细胞蛋白合成系统研究初期,存在着能源供应不足及 mRNA 模板不稳定的问题,这就导致真核无细胞合成系统的蛋白质产量较低且蛋白合成持续时间较短,因而小麦胚芽无细胞蛋白合成系统受到蛋白合成量低的限制,导致它只能用于放射性标记的多肽和蛋白的合成,且绝大多数用于分析目的^[23]。近十年来,人们对麦胚无细胞蛋白合成系统进行了一系列的优化,并且大大提高了该系统的蛋白合成持续时间和合成能力。人们利用生物方法去除了小麦胚芽抽提物中对核糖体、mRNA 和其他蛋白合成有损害的酶,改善了 ATP 再生能力,从而延长了蛋白质的合成时间,极大地提高了蛋白合成量。Shen 等^[24]从小麦胚芽中提取制备的小麦胚芽核糖体 RNA 添加到麦胚无细胞系统当中,发现可以将系统的蛋白质生产力提高到原来的 6 倍左右。Seki 等^[25]通过去除小麦胚芽抽提物中的蛋白水解酶,避免了蛋白质的降解,从而改善其蛋白合成效率。Wang 等^[23]通过将磷酸肌酸和丙酮酸添加到麦胚无细胞蛋白质合成系统中,极大地改善了 ATP 的再生能力,提高了蛋白质生产的持续时间 16 h 以上,产量由 0.13 mg/mL 提高至 0.74 mg/mL。目前,麦胚无细胞蛋白合成系统 24 h 能合成蛋白质大约 1 mg/mL,使用连续反应器并连续加入蛋白质合成的底物和能量再生物质可进一步延长蛋白合成时间,可达几天甚至 1~2 周^[26]。

麦胚无细胞蛋白合成系统的主要原料是小麦胚芽,它作为面粉工业的副产品,价格便宜,这就使得麦胚无细胞蛋白合成系统必将成为最经济的一种体外蛋白合成手段^[27]。在后基因组时代,随着蛋白质组学研究的发展和需求,麦胚无细胞蛋白合成系统

在结构蛋白质组学和功能蛋白质组学研究中的应用越来越广泛,也必将发挥越来越重要的作用。

2.2 在结构蛋白质研究中的应用

大规模的全基因组测序计划正产生越来越多的序列信息,而理解这些信息的关键是理解基因产物-蛋白质的结构与功能。在后基因组时代,蛋白质的结构解析是揭示生命密码的重要部分,是理解其生物学功能的前提及基础。以前“作坊”式的结构生物学研究已远远不能适应生物学的大发展和医学对生物学的迫切要求,它必须跨入到另一个更高的层次-工业化研究,即蛋白质结构工厂,这就使得高通量的结构基因组学(structural genomics)或结构蛋白质组学(structural proteomics)研究成为可能。早在1998年在美国 Argonne 召开的第一届结构基因组学研讨会上就探讨了高通量测定蛋白质结构的可行性,并分别由马黑兰基因组研究所(TIGR)、加州大学国家实验室(LANA)和 Berkley 国家实验室(LBNL)启动了测定细菌模式系统中全套蛋白质三维结构的研究计划^[28-29]。然而,高通量测定蛋白质结构面临着许多技术上的挑战。因此,在多学科的通力合作下,开发出大规模、高通量的基因克隆、蛋白表达、晶体生长和蛋白质三维结构测定的新方法、新途径。目前,已开发出的以小麦胚芽为原料的无细胞蛋白合成系统被证明能够在体外高通量表达具有结晶、折叠结构的高活性结构蛋白^[30]。所以,麦胚无细胞蛋白合成系统在蛋白表达、晶体生长及蛋白质折叠方面起着重要作用。

利用麦胚无细胞蛋白合成系统不仅可以进行蛋白质的高通量表达与结构解析,并且可以得到难于表达的膜蛋白和有细胞毒性的蛋白质。Noirot 等^[31]用麦胚无细胞蛋白合成系统生产对细胞有毒的朊病毒蛋白用于固态 NMR 结构研究,建立 Renilla 荧光素酶模型来优化和评价提取物的质量,依此报告了朊病毒 Ure2p 和 HET-s 的结构研究成果。Wang 等^[23]通过向麦胚无细胞蛋白合成系统中添加磷酸肌酸和丙酮酸,对再生 ATP 能源系统等进行优化改进后,将蛇毒激肽释放酶的产量由 0.13 mg/mL 提高至 0.74 mg/mL,为进一步研究该酶的结构奠定了良好的基础。Takai 等^[32]在麦胚无细胞蛋白合成系统中进行了植物蛋白 N-豆蔻酰化的研究,并分析 N-豆蔻酰化对植物蛋白氨基酸变化的影响,发现 6 位置的 Ser 和 7 位置的 Lys 影响 3 位置的氨基酸的选择。Masato 等^[33]的研究表明在麦胚无细胞蛋白合成系统中可以通过将探针(非天然氨基酸)引入多肽链中来检测辅助因子蛋白从载脂蛋白形式到全息形式的结构变化。Chieka 等^[34]在以小麦胚芽为原料的无细胞蛋白合成系统成功表达了蜕皮激素受体蛋白,这种体外合成蛋白的方法对昆虫生理机理的研究具有重要意义。此外,研究者们在用 NMR 技术解析一些水溶性较差或分子量偏大的蛋白质结构时,常显得束手无策^[35]。但是,Matsumoto 等^[36]用麦胚无细胞蛋白合成系统合成这些蛋白的重新折叠中间体(结构域),然后用 NMR 技术分析折叠中间体,就成功地解决了分子量偏大

的蛋白质结构的解析难题。

综上所述,以小麦胚芽为原料的无细胞蛋白合成系统已经成功地应用在蛋白质的合成方面,成为合成具有生物活性的折叠结构蛋白质最简便有效的新方法。这将为结构蛋白质组学的发展提供强有力的技术支撑。

2.3 在功能蛋白质研究中的应用

功能蛋白质组作为基因转录表达的重要产物,是生物体发挥功能的重要载体,因此功能蛋白质组学正在成为蛋白质研究的最重要的组成部分。功能蛋白是指具有生物体生理功能的蛋白质,如催化蛋白、运输蛋白、免疫蛋白、调节蛋白等,它们主要是完成机体的各种代谢活动^[37]。大多数酶是催化蛋白,血红蛋白是运输蛋白。免疫蛋白有白细胞中的蛋白,还有调节蛋白等,它们中大部分都是以酶的形式存在的,只有少部分以蛋白质形式存在^[38]。麦胚无细胞蛋白合成系统作为体外合成蛋白的一种新工具,目前已经生产出许多功能蛋白质,对蛋白质组学的研究产生了重要的影响。

Yang 等^[39]以酵母 tRNA 甲基转移酶作为模型蛋白,在麦胚无细胞蛋白合成系统中研究 Trm8 和 Trm82 两种蛋白的合成情况,确定了 Trm8-Trm82 异源二聚体的产生及其动力学参数。在麦胚无细胞系统中还能生产一些免疫蛋白,对人类免疫性疾病的研究有着重要意义。很多蛋白质对宿主细胞有毒性且具有复杂的构象,所以很难通过重组 DNA 技术或者传统的原核无细胞蛋白合成系统来合成^[27]。Tsuboi 等^[40]发现利用麦胚无细胞蛋白合成系统可以用于筛选新型疟疾疫苗,这将加速后基因组时代新型疟疾疫苗的研制。在麦胚无细胞蛋白合成系统中,两大一小的转氨酶的活性很容易被抑制,但并不降低蛋白质的合成产量。Shimizu 等^[41]在麦胚无细胞蛋白合成系统中成功构建了一种完整的氨基酸选择标记技术,这种脯氨酸特异性标记技术可结合异核多维 NMR 光谱来研究蛋白质结构与功能的关系。Saeki 等^[42]开发了一种用于无细胞蛋白合成的微区分的海藻酸盐微胶囊,在胶囊中加入酶和 DNA 模板来合成绿色荧光蛋白,通过荧光显微镜观察微胶囊中的蛋白质合成情况,这种系统有望用于高通量的活性酶筛选,也是对麦胚无细胞蛋白合成系统的完善。综上所述,利用麦胚无细胞蛋白合成系统可以有效地合成功能性蛋白和进行蛋白质功能性的研究。因此,以小麦胚芽为原料的无细胞蛋白合成系统是蛋白质功能性研究的重要手段,为蛋白质组学研究提供重要保证,将对后基因组时代的生物学研究产生重大意义。

3 展望

随着生物技术的快速发展,对传统意义上的农产品开发利用提出了新的理念和要求,将小麦胚芽加以深层次开发利用,形成具有高附加值的生物新材料(原料)越来越受到人们的重视。小麦胚芽中含有丰富的生物活性物质和活性极高的蛋白合成因子、辅助因子及其他相关酶系,利用生物技术直接将

小麦胚芽抽提物作为无细胞蛋白合成系统的原料显示出了无可比拟的优势,极大地降低了体外蛋白质合成的成本,使人类重组蛋白表达和制备变得更为简单、快捷、可靠、经济,因此,无细胞蛋白合成系统已经成为一种十分有市场前景的蛋白质合成工具(手段)。目前,市场上出现了用麦胚无细胞蛋白合成系统生产的相关产品。例如,美国 GeneCopoeia 和德国罗氏应用科学部(Roche Applied Science)联合推出一套基于麦胚提取物的无细胞转录及翻译系统,专门用于构建可直接表达的编码人类全长蛋白的 ORF 克隆(覆盖 20000 个人类基因)的体外重组蛋白表达体系。同时,以小麦胚芽为原料的无细胞蛋白合成系统还使得高通量的体外蛋白质合成、多种酶的商品化生产成为可能,它也是生物制药和医疗方面筛选功能性蛋白的一种新方法;另外,小麦胚芽无细胞蛋白合成系统在后基因组时代蛋白质组学的研究及在分子水平上进行功能性食品的营养学的研究上也提供了极大的便利,这些优势为小麦胚芽的深层次开发利用提供了重要依据。然而,以麦胚无细胞蛋白合成为代表的真核系统内部调控机制比原核系统复杂的多,对多基因的功能性表达也尚未被完全掌握,这就在某种程度上限制了麦胚无细胞蛋白合成系统的应用。因此,在麦胚为代表的无细胞系统中实现多基因的功能性表达,将有利于研究一系列相关蛋白的相互作用和构建多药物靶点共筛选模型,这将大大拓展麦胚无细胞蛋白合成系统的应用范畴。

参考文献

- [1] 徐斌,董英.小麦胚芽的产业化开发现状与发展趋势[J].农业工程学报,2011,27(2):341-345.
- [2] Shurpalekar SR, Haridas RP. Wheat germ [J]. Advances in Food Research, 1977, 12:187-304.
- [3] Malecka M. Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil [J]. Food Chemistry, 2002, 79(3):327-330.
- [4] 张苏阳,蒋开年,王煜,等.甘松多糖的体外抗氧化性研究[J].华西药学杂志,2009,24(2):145-146.
- [5] 张婷,刘婉,张艳贞,等.小麦胚芽生物活性物质及其功能特性研究进展[J].食品科学,2011,32(3):281-285.
- [6] Ge Y, Sun A, Ni Y, et al. Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(12):6215-6218.
- [7] 孔兆钦,孙宪法,孔宪一,等.快速连续酿造系列含有抗癌物的啤酒的酿造方法 CN91111019.4[P].1991.
- [8] Lamborg MR, Zamecnik PC. Amino acid incorporation into protein by extracts of E.coli [J]. Biochim Biophys Acta, 1960, 42:206-211.
- [9] Zamecnik PC, Stephenson ML, Hecht LI. Intermediate reactions in amino acid incorporation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, 44(2):73-78.
- [10] Nirenberg MW, Matthaei JH. The Dependence of cell-free protein synthesis in E.coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides [J]. Biochemistry, 1961(47):1588-1602.
- [11] 章杰,刘琼明,贺福初,等.无细胞系统原位制备蛋白质芯片及其应用[J].生物化学与生物物理进展,2009,36(4):391-397.
- [12] Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, et al. Cell-free protein synthesis: Applications come of age [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5):1185-1194.
- [13] Endoh T, Kanai T, Sato YT, et al. Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile [J]. Biotechnol, 2006, 126(2):186-195.
- [14] Mikami S, Kobayashi T, Yokoyama S, et al. A hybridoma-based *in vitro* translation system that efficiently synthesizes glycoproteins [J]. Biotechnol, 2006, 127(1):65-78.
- [15] He MY, Stoevesandt O, Taussig MJ. In situ synthesis of protein arrays [J]. Curr Opin Biotechnol, 2008, 19(1):4-9.
- [16] Kim HC, Kim TW, Kim DM. Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source [J]. Process Biochem, 2011, 46(6):1366-1369.
- [17] 洪上励,苏志宁.无细胞蛋白表达系统研究进展[J].科技经济市场,2009(6):14-15.
- [18] Sudha ML, Srivastava AK, Leelavathi K. Studies on pasting and structural characteristics of thermally treated wheat germ [J]. European Food Research and Technology, 2007, 225(3/4):351-357.
- [19] 徐斌,董英.天然产物有效成分的亚临界流体萃取装置与方法 CN200910034263.3[P].2009.
- [20] Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, et al. MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antitumour effect [J]. Cancer Biotechnology & Radio pharmaceuticals, 1999, 14(4):277-289.
- [21] Madono M, Sawasaki T, Morishita R, et al. Wheat germ cell-free protein production system for post-genomic research [J]. New Biotechnology, 2010, 28(3):211-217.
- [22] Singh H, Akino S, Endo Y, et al. Application of the wheat-germ cell-free translation system to produce high temperature requirement A3 (HtrA3) proteases [J]. Bio Techniques, 2012, 52(1):23-28.
- [23] Wang Y, Xu W, Kou X, et al. Establishment and optimization of a wheat germ cell-free protein synthesis system and its application in venom kallikrein [J]. Protein Expression and Purification, 2012, 84(2):173-180.
- [24] Shen XC, Yao SL, Fukano H, et al. Ribosomal RNA Supplementation Highly Reinforced Cell-Free Translation Activity of Wheat Germ [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(1):68-72.
- [25] Seki E, Matsuda N, Kigawa T. Multiple inhibitory factor removal from an Escherichia coli cell extract improves cell-free protein synthesis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(1):30-35.
- [26] 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[J].PNAS,2000,97(2):559-564.

[27] Jung GY, Lee EY, Kim Y, et al. Stabilization Effect of Zeolite on DHFR mRNA in a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 89(2):193-195.

[28] Gaasterland T. Structural genomics taking shape[J]. Trends in Genetics, 1998, 14(4):135.

[29] 王大成. 后基因组时代中的结构生物学[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(4):340-344.

[30] Morita EH, Sawasaki T, Tanaka R, et al. A wheat germ cell-free system is a novel way to screen protein folding and function[J]. Protein Science, 2003, 12(6):1216-1221.

[31] Noirot C, Habenstein B, Bousset L, et al. Wheat-germ cell-free production of prion proteins for solid-state NMR structural studies[J]. New Biotechnology, 2010, 28(3):232-238.

[32] Kazuyuki T, Sawasaki T, Endo Y. The Wheat-Germ Cell-Free Expression System [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11(3):272-278.

[33] Abe M, Ohno S, Yokogawa T, et al. Detection of structural changes in a cofactor binding protein by using a wheat germ cell-free protein synthesis system coupled with unnatural amino acid probing[J]. Proteins, 2007, 67(3):643-652.

[34] Minakuchi C, Nakagawa Y, Soya Y, et al. Preparation of Functional Ecdysteroid Receptor Proteins (EcR and USP) Using a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System[J]. Journal of Pesticide Science, 2004, 29(3):189-194.

[35] Kameda A, Morita E, Sakurai K, et al. NMR-based characterization of a refolding intermediate of beta2-microglobulin

labeled using a wheat germ cell-free system[J]. Protein Science, 2009, 18(8):592-601.

[36] Matsumoto K, Tomikawa C, Toyooka T, et al. Production of yeast tRNA (m^{sup}(7)G46) methyltransferase (Trm8-Trm82 complex) in a wheat germ cell-free translation system[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 133(4):453-460.

[37] Wilkins MR, Williams KL, Sanchez JC, et al. Progress Proteome Projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it [J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 1996, 13(2):19-50.

[38] 贺福初, 孙建中, 叶鑫生, 等. 蛋白质科学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002:1-74.

[39] Yang JH, Kanter G, Voloshin A, et al. Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89(5):503-511.

[40] Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, et al. The wheat germ cell-free protein synthesis system: A key tool for novel malaria vaccine candidate discovery [J]. Acta Tropica, 2010, 114(3):171-176.

[41] Shimizu M, Ikegami T, Akiyama K, et al. A Novel Way to Express Proline-Selectively Labeled Proteins with a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System[J]. Biochemistry, 2006, 140:453-456.

[42] Saeki D, Sugiura S, Kanamori T, et al. Micro compartmentalized cell-free protein synthesis in semipermeable microcapsules composed of polyethylenimine-coated alginate[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(2):199-204.

(上接第378页)

officinale) rhizomes during storage[J]. Journal of herbs, spices & medicinal plants, 2007, 12(1-2):25-35.

[29] Alakali J, Irtwange S, Abu J. Effect of processing methods and storage environment on moisture adsorption characteristics of ginger (Zingiber Officinale) [J]. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development, 2009, 9(5):1245-1257.

[30] 袁学军, 戴玉淑, 王海霞. 鲜姜贮藏技术[J]. 现代农业, 2000, (4):24.

[31] 杨玉栋, 张俊强. 生姜贮藏技术[J]. 农村新技术, 2011, (2):66.

[32] 陈丙奎, 郁建平. 加工及贮藏对干姜质量的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(3):369-370.

[33] 肖远金. 姜的贮藏保鲜技术[J]. 现代农业, 2001, (9):29.

[34] 秦继伟. 生姜贮藏技术[J]. 蔬菜, 2010, (3):23.

[35] 严贤春, 郭正贤. 生姜贮藏技术[J]. 农牧产品开发, 2000, (3):18-19.

[36] 陈永强. 鲜姜四季砂贮藏保鲜实验总结[J]. 安徽农学通报, 2008, 14, (23):109.

[37] 申恩情, 社会祥, 张万坤, 等. 罗平小黄姜的贮藏保鲜新方法[J]. 中国蔬菜, 2008, (8):24-26.

[38] Queiroz M A P, Neto J T, Arthur V, et al. Gamma radiation, cold and four different wrappings to preserve ginger rhizomes, Zingiber officinalis Roscoe[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2002, 63(3):341-343.

[39] Massolo J F, Concellón A, Chaves A R, et al. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (Solanum melongena L.) fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 59(1):10-15.

[40] Huang S, Li T, Jiang G, et al. 1-Methylcyclopropene reduces chilling injury of harvested okra (Hibiscus esculentus L.) pods [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 141:42-46.

[41] 张曼, 李喜宏, 李伟丽, 等. 1-MCP 对低温胁迫下鲜姜的生理调控效果[J]. 食品科学, 2012, 33(18):303-306.

[42] Wu J J, Yang J S. Effects of gamma irradiation on the Volatile Compounds of ginger Rhizome (Zingiber officinale Roscoe) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(11):2574-2577.

[43] Variyar P S, Gholap A, Thomas P. Effect of γ -irradiation on the volatile oil constituents of fresh ginger (Zingiber officinale) rhizome[J]. Food research international, 1997, 30(1):41-43.

[44] Nwachukwu E, Ene L, Mbanaso E. Radiation Sensitivity of two Ginger Varieties (Zingiber officinale Rosc.) to Gamma Irradiation[J]. Der Tropenlandwirt-Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics, 1994, 95(1):99-103.

[45] Mishra B B, Gautam S, Sharma A. Shelf-Life Extension of Fresh Ginger (Zingiber officinale) by Gamma Irradiation [J]. Journal of Food Science, 2004, 69(9):274-279.