

## 无细胞蛋白质表达系统的优化与应用

张裕, 周化岚, 张建国\*, 黎京滔, 辛艺

(上海理工大学健康科学与工程学院, 食品科学与工程研究所, 上海 200093)

**摘要:** 无细胞蛋白质表达系统(cell-free protein expression systems, CFPS)是一种快速发展的蛋白质表达系统, 由细胞裂解物、能源物质、底物和外源模板在细胞外转录、翻译和折叠来合成目的蛋白质。与传统体内表达体系相比, 无细胞表达系统没有细胞生长过程, 没有细胞壁阻碍, 可操作性强, 是探索蛋白质遗传密码、制备特殊蛋白、开展高通量药物筛选和蛋白质组学研究的重要工具。本文介绍了无细胞蛋白质表达系统的不同类型, 分析了影响体系活力的原因, 并阐述了优化体系表达量的方法和策略。文章对CFPS的优化中运用新兴材料与基因模板相结合提高蛋白质表达量的技术进行了详细论述, 并总结了无细胞蛋白质表达系统的实际应用, 显示了其在合成蛋白质领域的重要潜力。

**关键词:** 细胞裂解液; 无细胞蛋白质表达系统; 蛋白质合成; 优化和应用

## Optimization and application of cell-free system for protein expression

ZHANG Yu, ZHOU Hualan, ZHANG Jianguo\*, LI Jingtiao, XIN Yi

(Institute of Food Science and Engineering, School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** The cell-free protein expression systems (CFPS) are rapidly developing protein expression systems that synthesize target proteins through extracellular transcription, translation and folding in the presence of cell lysates, energy supplier, substrates and templates. Compared with the traditional *in vivo* expression systems, the CFPS systems have advantages of no cell growth process, no cell wall obstruction, and strong operability. CFPS are important tools for exploring the genetic code of proteins, producing special proteins, and conducting high-throughput drug screening and proteomics research. In this review, different types of cell-free protein expression systems were elaborated, and the parameters affecting the viability of the system were clarified. The paper also presented the technology of using emerging materials and gene templates to improve protein expression in the optimization of CFPS. Finally, the practical applications of cell-free expression system were summarized and its important potential in the field of protein synthesis was demonstrated.

**Key Words:** cell lysate; cell-free protein expression system; protein synthesis; optimization and application

### 1 无细胞蛋白质表达系统介绍

无细胞蛋白质表达系统为体外模拟细胞表达

蛋白质的体系, 可以进行基因转录、翻译, 最终表达目的蛋白质<sup>[1]</sup>。它与传统的细胞蛋白质表达系

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31870045)

第一作者: E-mail: 1144951389@qq.com

\*通信作者: E-mail: jgzhang@usst.edu.cn

统相比,具有反应快速、操作高通量、控制精准、系统自由度大的特点(表1),因而备受研究者的青睐。无细胞蛋白质表达系统的发展始于20世纪50年代末, Schweet等<sup>[2]</sup>利用C<sup>14</sup>标记的氨基酸开发了基于兔网织红细胞的无细胞蛋白质表达系统,但由于当时技术手段有限,系统合成效率很低。无细胞蛋白质表达系统快速发展始于1991年, Nevin等<sup>[3]</sup>利用T7启动子和T7 RNA聚合酶实现了体外系统快速、专一表达目标蛋白,极大提高了大肠杆菌体外合成系统的效率。T7启动子一直沿用至今,目前尚未找到比T7启动子更高效的能运用在无细胞蛋白质表达系统中的其它启动子。目前,无细胞蛋白质表达系统的研究主要面向大规模蛋白质合成,期待成为传统蛋白质表达系统的替代方案<sup>[4]</sup>。随着合成生物学技术的发展,无细胞蛋白质表达系统不仅有包含蛋白质翻译、折叠和能量再生的所有生物成分的“自上而下”无细胞蛋白质表达系统(cell-free protein expression system, CFPS),也建立了只包含蛋白质翻译所需的酶和辅助因子的“自下而上”重组原件蛋白质表达系统(protein synthesis using recombinant elements, PURE)。

### 1.1 CFPS

CFPS系统一般以大肠杆菌、小麦胚芽或兔网织红细胞等细胞裂解液为主要组分,加入外源模板DNA或mRNA,并补充氨基酸、相关酶、蛋白因子和核苷三磷酸等反应底物和ATP再生组分,从而在体外环境中进行蛋白质的表达合成(图1)。CFPS中没有细胞生长的过程,可直接优化CFPS体系的成分和条件,快速得到方便纯化的单一蛋白

质产物。无细胞蛋白质表达系统是没有细胞壁阻碍的开放系统,方便研究者实时且主动地监测蛋白质的合成情况。鉴于CFPS体系内未纯化成分含有的蛋白酶或核酸酶会降解蛋白质产物或模板核酸,造成蛋白质产量低,通常研究者会根据不同种类细胞的CFPS来具体优化。下面将依据裂解液不同分类的五种常用无细胞蛋白质表达系统进行总结。

#### 1.1.1 大肠杆菌裂解液无细胞蛋白质表达系统

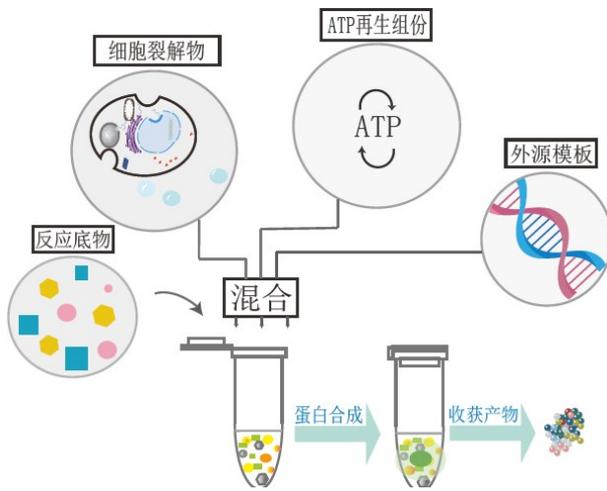
大肠杆菌生长快、代谢活跃,因此,基于大肠杆菌裂解液(*E. coli* extract, ECE)的CFPS具有较高的蛋白质表达效率<sup>[15,16]</sup>。2016年, Garamella等<sup>[13]</sup>利用磷酸盐供体和碳源的ATP再生代谢,以半连续模式的合成系统合成了超过6 mg/mL的不稳定增强型绿色荧光蛋白。该方法通过激活糖酵解途径和无机磷酸盐再循环抑制副产物的生成,延长蛋白质合成的时间。然而, ECE产物有高聚集倾向和截短产物的缺点。Gagoski等<sup>[17]</sup>应用ECE的CFPS表达了87种在N端融合了GFP的人细胞质蛋白,结果表明,相对分子质量超过70 000的人细胞质蛋白相对分子质量明显降低,且只有10%的表达蛋白质以单体形式存在。总的来说, ECE在CFPS所有系统中具有最高的蛋白质表达率,且能够高通量地表达蛋白质,但其缺点包括:蛋白质的翻译后修饰较困难、不能正确折叠复杂蛋白质、缺少内源性的膜结构来整合膜蛋白,这些在一定程度上限制了该系统的应用。

#### 1.1.2 小麦胚芽裂解液无细胞蛋白质表达系统

休眠的小麦胚芽含有丰富的蛋白质、生物活性物质、蛋白质合成因子、辅助因子及其它相关酶系<sup>[18,19]</sup>,故小麦胚芽为萌发储备了大量的翻译机

表1 无细胞蛋白质表达系统与细胞蛋白质表达系统对比

对比项目	CFPS	细胞蛋白质表达系统	参考文献
合成时间	非常快速,分批3~6 h/批	缓慢且耗时,从1~2周不等	[5,6]
DNA模板	可直接从线性模板DNA开始	需要合成完整质粒	[7]
毒性蛋白	合成大多数有毒蛋白质的理性选择	有毒物质很难合成	[8,9]
膜蛋白	适用于各种膜蛋白表达	膜蛋白过表达导致细胞毒性和死亡	[10]
产物应用	产物应用简单,蛋白质可直接纯化	产物可以应用,但需要裂解细胞得到产物	[11]
灵活性	完全开放体系,反应易于操作	完全封闭系统,难以操作	[12]
反应体积	从基于批次处理 $\mu$ L级别到100 L发酵罐	最少mL级别	[13]
功能描述	标准的生化分析是有限的,但最近取得了进展	已取得了标准化生物物理和生化技术分析	[14]



四种组分：用于转录和翻译的反应底物、细胞裂解物、ATP再生组分、外源模板DNA或mRNA

图1 无细胞蛋白质表达系统示意图

器。基于此特点，学者们建立了以小麦胚芽裂解液为原料的无细胞蛋白质合成系统(wheat-germ extract, WGE)。WGE的蛋白质表达量在真核无细胞蛋白质表达系统中最高。例如，1 mL体系的WGE能在24 h内合成蛋白质约1 mg，而且连续加入底物和能量再生物质可延长1~2周反应时间，表达更多蛋白质<sup>[13]</sup>。WGE还可进行蛋白质高通量表达与结构解析，获取难表达的细胞毒性蛋白质和病毒蛋白质<sup>[8,9]</sup>。WGE固然有强大的表达功能，其不足是制备小麦胚芽裂解液困难且处理工作量大。制备5 mL高活性小麦胚芽裂解液需要5~6 kg原料处理4~5 d<sup>[20]</sup>。其次，WGE缺乏蛋白质糖基化等翻译后修饰功能<sup>[21]</sup>。

### 1.1.3 兔网织红细胞裂解液无细胞蛋白质表达系统

真核体外系统中技术发展最成熟的是兔网织红细胞无细胞蛋白质表达系统(rabbit reticulocyte lysate, RRL)。1958年，Schweet等<sup>[22]</sup>就利用RRL成功在体外合成了血红蛋白。RRL的优点是裂解物易于制备、翻译产物保真性强且能进行翻译后蛋白质修饰，故RRL成为最有效的哺乳细胞无细胞蛋白质表达系统<sup>[11]</sup>。然而，RRL的局限性为蛋白质产量低以及兔网织红细胞裂解液成本高等。Anastasiu等<sup>[23]</sup>为了提高RRL的翻译能力，在靶mRNA中添加翻译上调因子——丙型肝炎内部核糖体进入位点(internal ribosome entry sites, IRES)，并添加甲型流感病毒NS1蛋白，与未改造靶mRNA不添加NS1蛋白的系统相比，该系统将体外荧光素酶翻译合

成能力提升到了10倍。参考RRL中提高表达量的翻译元件，Rol-Moreno等<sup>[24]</sup>利用单粒子低温电子显微镜从RRL中分离出装配在体外转录mRNA上的起始复合物(initiation complexes, ICs)。该ICs有利于研究包含IRES在内的多种mRNA翻译起始元件。而且，ICs也适用于其它细胞裂解液，促进了无细胞蛋白质表达系统的多样化发展。

### 1.1.4 昆虫细胞裂解液无细胞蛋白质表达系统

由于哺乳动物细胞难以产出控制多种生理过程的杆状病毒蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)<sup>[25]</sup>，而昆虫细胞是表达PKC的常用宿主<sup>[26]</sup>，因此，基于昆虫细胞裂解物的无细胞蛋白质表达系统(insect cell extract, ICE)就成为PKC的主要生产方式之一<sup>[10]</sup>。现在制备ICE裂解液常用的昆虫种类有粉纹夜蛾和草地夜蛾。这两种昆虫传代稳定且较其它昆虫的蛋白质表达量高<sup>[27]</sup>。由于制备昆虫细胞提取物采用耗时长、成本高和操作难的高压氮气提取，Ezure等<sup>[28]</sup>建立了以20%甘油提取缓冲液制备粉纹夜蛾细胞裂解液的简单、廉价的冻融法。2010年，Ezure等<sup>[29]</sup>继续优化ICE系统，在冻融法的基础上优化了增强子序列和反应组分，使重组蛋白在结构和功能上更接近天然蛋白质并实现了ICE商业化。目前，在不添加酶和辅因子的条件下，ICE体系可以进行翻译后修饰从而表达具有天然高级结构的蛋白质，例如，Marlitt等<sup>[10]</sup>在无内毒素的ICE中合成了具有天然结构的胞质蛋白、膜蛋白和糖基化蛋白等多种蛋白质。

### 1.1.5 酵母裂解液无细胞蛋白质表达系统

酵母是常用的真核模式生物，且大量代谢组学研究已证明，酵母裂解液可有效地用于无细胞蛋白质表达系统，而酵母也更适合表达真核蛋白。Rothblatt等<sup>[30]</sup>研究表明，酵母无细胞蛋白质表达系统不受多种解偶联剂、离子载体或抑制剂的影响翻译表达糖基化蛋白。Sullivan等<sup>[31]</sup>利用酿酒酵母制备细胞裂解物，24 h内体外合成并纯化重组人促红素和重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子，该过程可实现原核或真核裂解物在不同蛋白质纯化流程中生产特定靶模式下的各种蛋白质。目前，通过删除源菌株中对CFPS有害的酶如核糖核酸酶等提高蛋白质合成产率需要花费大量的时间。Schoborg等<sup>[32]</sup>为快速寻找高活性酵母原型菌株，在



## 2 无细胞蛋白质表达系统的优化

无细胞蛋白质合成系统中组分暴露于外界环境中, 成分含量由人工控制, 因此, 反应中蛋白质合成很容易受环境或人为干扰和破坏。优化无细胞蛋白质表达系统首先考虑从系统内部组分入手, 如从细胞种类、生长时期的选择和裂解物的制备方式来考虑优化裂解物活力; 从线性模板和在模板上添加优化序列考虑来优化外源模版; 从体系环境和体系组分入手来优化反应体系。其次, 优化无细胞蛋白质表达系统可考虑加入新兴材料辅助等, 探索低成本和高活力的无细胞方案需要根据不同系统的特点进行调整。

### 2.1 裂解物活力

细胞裂解物作为无细胞蛋白质表达系统的关键成分, 占反应体系体积的50%, 裂解物的活力与菌种、生长状态和制备方式均有关系。首先, 使用蛋白酶缺陷型、核酸酶缺陷型或核糖体浓度高的菌种表达蛋白质效果较好。Spice等<sup>[38]</sup>通过过表达转录调节因子而获得更高核糖体浓度的法夫驹形氏酵母菌株, 与野生型酵母菌株相比蛋白质表达量提升了3倍。其次, 对数期早期的细胞适合制备细胞裂解液。Li等<sup>[39]</sup>研究表明, 高密度细胞可获得高浓度裂解液持续支持CFPS体系能量再生和蛋白质合成, 蛋白质合成效率可提升2倍以上。Rothblatt等<sup>[30]</sup>与Li等<sup>[39]</sup>研究都表明, 对数期早期的细胞蕴含丰富的高活性酶, 合成sfGFP的能力比处于其他时期的细胞最多高3倍。最后是裂解方法的选择, 破碎细胞制备裂解液的常见方式有珠磨法、高压匀浆器和超声波破碎法等。Kwon等<sup>[40]</sup>提出, 裂解液制备体积大于5 mL时利用超声破碎和高压破碎法维持低温还原性环境得到的裂解液活性最高。当裂解液的体积小于5 mL时, Zhang等<sup>[41]</sup>对上述3种方法进行比较, 结果表明, 利用成本低廉操作简单的珠磨法制备裂解液时蛋白质合成量最高。目前, Fujiwara等<sup>[42]</sup>提出, 利用溶菌酶、渗透休克和冻融循环的组合法制备裂解液亦能合成GFP。然而, 酶处理法的高成本限制了其在工业生产中的应用, 因此, 酶的回收再利用是制约该方法发展的关键。

### 2.2 模板优化

无细胞蛋白质表达系统中的mRNA由于被核

酸酶降解, 而不能重复翻译<sup>[43]</sup>, 利用环形模板线性化和在模板上添加元件的方式可提高mRNA的稳定性。由于线性DNA表达模板(linear DNA expression templates, LET)具有绕过传统质粒克隆步骤的优点, Murphy等<sup>[7]</sup>利用噬菌体 $\lambda$  red重组系统替换大肠杆菌recB14的recBCD操纵子, 使LET翻译水平接近环形质粒的翻译水平。Seki等<sup>[44]</sup>加入链霉亲和素去除核酸酶, 同时降低反应温度使核酸酶活性降低, 达到减少核酸酶对LET的影响和增加蛋白质合成效率的目的。

IRES是一类特殊的RNA序列, 能与核糖体结合触发mRNA通道打开并绕过起始过程启动翻译<sup>[45]</sup>。在模板DNA上插入内部核糖体进入位点IRES能有效改善无细胞蛋白质表达系统的效率。例如, Hodgman等<sup>[46]</sup>只使用蟋蟀麻痹病毒(cricket paralysis virus, CrPV)基因的前12个核苷酸序列, 与不添加IRES的CFPS系统相比, 将蛋白质合成量提高了2.5倍。目前, 常用的IRES元件主要来自烟草花叶病毒、CrPV和Plautia stali肠道病毒等, 由于不同CFPS系统IRES的选择存在差异, 至今还未发现通用的IRES元件。

poly(A)是位于mRNA 3'端大小为50~200 nt的多腺苷酸片段, 在体内系统中poly(A)是RNA与DAZL蛋白质相互作用的关键因素<sup>[47]</sup>。在体外系统中, poly(A)保护mRNA不受核酸酶攻击。有研究表明, 与不加poly(A)序列的酵母无细胞蛋白质合成系统相比, 添加50 bp的poly(A)能使该系统的蛋白质合成量提高4.5倍<sup>[46]</sup>。但并没有研究证明poly(A)的长度越长, 体外系统蛋白质表达效果越好。

### 2.3 体系优化

pH影响体系内的酶活和反应效率。CFPS中添加葡萄糖可以延长ATP的供应时间, 但过量葡萄糖会产生有机酸降低反应pH, 导致蛋白质合成的抑制。Kim等<sup>[48]</sup>采用稳定释放葡萄糖到CFPS中, pH变化率显著减小, 且蛋白质合成时间延长至12 h。Karim等<sup>[49]</sup>设计了一个由pH调控ECE的CFPS模型, 发现pH能调控大肠杆菌的糖酵解速率和梭状芽孢杆菌正丁醇异源合成途径。因此, 可以通过pH来调控CFPS的代谢途径和操控酶的筛选。

Miguez等<sup>[50]</sup>发现, 在ECE反应中补充多种代谢物能刺激GFP合成。与正常反应的原始CFPS相

比,高浓度的 $\beta$ -丙氨酸和高半胱氨酸能将蛋白质合成量提高2.5倍。同时,Zhang等<sup>[51]</sup>在CFPS中加入T7 RNA聚合酶、核糖体再循环因子、翻译起始因子和延伸因子Tu,与原始系统相比,蛋白质表达量提升了2.5倍,且补充单一代谢物的原始系统GFP表达量能提高1.9倍。此外,调节CFPS组分也显著影响了CFPS的活力。Cai等<sup>[52]</sup>在ECE合成免疫球蛋白G曲妥珠单抗时发现,谷氨酸钾浓度加倍,去除丙酮酸、辅酶A和腐胺等后,与原始系统相比获得降低了95%成本的高产ECE系统。常规CFPS中磷酸盐螯合镁离子会抑制蛋白质合成<sup>[53]</sup>,目前,利用葡萄糖作为CFPS能源物质提供ATP不仅能降低成本,而且不会导致无机磷酸盐积累<sup>[52]</sup>。巴斯德毕赤酵母制备细胞裂解物的CFPS中存在大量核黄素,造成监测GFP信号的干扰,Surribas等<sup>[54]</sup>利用超滤法除去清液中核黄素后减轻了这一干扰。

## 2.4 其他方面优化

CFPS需要大分子拥挤效应来模拟细胞质环境,利用特殊材料与基因模板结合构建分子拥挤的环境可以提高蛋白质表达量。纳米黏土是一种拥有静电吸引特性的圆盘状混合材料,能对质粒产生近100%强吸附效应,实现对基因模板的固定与聚集,达到CFPS分子拥挤效应<sup>[55]</sup>。纳米黏土吸附的质粒越多,蛋白质产量越高,根据纳米黏土材料的静电吸引力确定最佳的黏土与基因模板的浓度配比,与不使用纳米黏土的CFPS相比可将体外蛋白质合成效率提升1.75倍<sup>[56]</sup>。热响应水凝胶是高含水量的网状材料,可保护和封装生物分子的活性实现药物输送<sup>[57]</sup>。热响应水凝胶在CFPS中包裹质粒,通过环境温度变化释放质粒,形成局部基因模板的大分子拥挤效应,与不使用水凝胶的CFPS相比可将蛋白质合成量提升3.7倍<sup>[56]</sup>。与纳米黏土不同,水凝胶高浓度质粒会阻碍CFPS的转录和翻译。然而,低浓度质粒会导致无法形成大分子拥挤效应,因此,寻找水凝胶质粒的合适浓度是应用该材料的难点。

超分子材料金属有机框架(metal organic framework, MOF)具有孔状结构,能在CFPS中构建区室包裹质粒,形成分子拥挤效应以提高蛋白质合成量<sup>[58]</sup>。Miguez等<sup>[50]</sup>利用MOF材料,与不添加特殊材料的CFPS相比将CFPS的蛋白质合成量提

升了2.7倍。与水凝胶材料类似,MOF包裹质粒的量是研究重点。

## 3 CFPS应用

作为体外合成蛋白质的一种有力工具,CFPS目前已应用到多个领域。首先,CFPS在蛋白质工程中具有重要作用。传统蛋白质产品的生产方式主要包括以动物为原料获取、工程菌表达和化学合成。与传统方式相比,CFPS可精确调控体系环境和参与蛋白质合成各因子,使毒性蛋白质合成、膜蛋白表达和非天然氨基酸嵌入变得简单。其次,高效重组蛋白药物的开发和蛋白类药物产品的升级倍受重视,而体内表达系统表达重组蛋白对细胞毒性大,且易被胞内蛋白降解。CFPS可提供二硫键折叠环境<sup>[20]</sup>,对药物蛋白进行化学修饰,拓展对蛋白质的操作空间,为解决蛋白质药物研发难题提供了解决方案。因此,CFPS在医药产品生产方面发挥了重要作用,研究开发了许多相关疫苗、抗体和后修饰药物。最后,随着对细胞提取物、生产方式和代谢网络等方面的优化,CFPS已经突破了基础研究的应用范围,与快速诊断密不可分。CFPS用于便携式快速检测和无细胞生物传感器的潜力被不断开发,且运用简单设备获得快速诊断结果的准确性与高效液相色谱法不相上下。下面将对CFPS在毒性蛋白质合成、疫苗和便携式快速检测方面的应用进行详细介绍。

### 3.1 毒性蛋白质合成

为研究不同CFPS对有毒物质的耐受能力,Zhang等<sup>[59]</sup>选择了表面活性剂、脂质、生物燃料和化学药物进行研究,结果表明,ECE耐受能力远高于细胞体内表达系统。该研究为CFPS合成有毒的生物药物、生物化学品和生物燃料提供了理论基础。如海洋生物芋螺毒腺的芋螺毒素能治疗中风、慢性癫痫、心血管疾病等<sup>[60]</sup>,但其在生物有机体内的含量少,大量提取存在困难。梁雅婷等<sup>[61]</sup>构建了相应质粒并在ECE中加入翻译后修饰酶:脯氨酸羟基化酶、谷氨酸环化酶和二硫键异构酶,实现了芋螺毒素的体外生物合成。鲍曼不动杆菌是战创伤常见的致病分离株,为伤员高死亡率的关键原因<sup>[62]</sup>。噬菌体疗法的穿孔素在裂解细菌过程发挥关键作用,可以治疗多重耐药不动

杆菌感染<sup>[63]</sup>。利用穿孔素 $Abp$ 基因与 $gfp$ 基因融合, 实现了在CFPS中多重耐药鲍曼不动杆菌噬菌体 $Abp1$ holin $Abp1$ -GFP融合毒力蛋白质的成功表达<sup>[64]</sup>, 为CFPS合成穿孔素提供了解决方案, 也为治疗战创伤耐药细菌感染奠定了基础。

### 3.2 疫苗

疟疾疫苗研究开发昂贵又耗时, 目前利用WGE系统可加速疫苗研发, 并建立高通量疟原虫抗体筛查系统<sup>[65]</sup>。Yang等<sup>[66]</sup>构建了ECE表达B淋巴细胞Id的疫苗蛋白, 利用巯基缓冲液和碘乙酰胺预处理的细胞裂解液, 促进了Id疫苗蛋白合成时二硫键的形成。Stark等<sup>[6]</sup>利用大肠杆菌的便携式冻干裂解物再水化, 1 h内合成高致病性病原体土拉弗朗西斯菌亚种的生物偶联疫苗, 与工程菌生产的疫苗相比, 其可引发更高水平的病原体特异性抗体。

### 3.3 便携式快速检测

CFPS克服了利用哺乳动物生产蛋白质时的生物危害和伦理问题。2020年全球新冠肺炎疫情蔓延, CFPS可用血清学测试检测新冠肺炎<sup>[67]</sup>, 也适用于冻干技术研发新冠病毒快速检测试纸。冻干纸基化的CFPS操作简单、成本低廉, 只需在室温下加入少量配套无核酸水即可完成反应。针对研究肠道微生物与宿主相互作用的微生物组方法复杂、昂贵且缓慢。Takahashi等<sup>[68]</sup>开发了基于纸张的CFPS, 实现了对10种细菌和4种宿主生物标志物mRNA进行特异性检测。目前, 基于转基因技术的生物传感器是快速检测饮用水中有害物质的常用工具, 但是这些传感器在保存时间、可用范围和生物安全性等方面受到限制。Gräwe等<sup>[14]</sup>利用福氏志贺氏菌转录激活因子的无细胞生物传感器实现了对水中6  $\mu\text{g/L}$ 的 $\text{Hg}(\text{II})$ 离子检测, 且能够配合带有简单滤光器的传统智能手机监测sfGFP表达。

## 4 总结

CFPS潜力巨大, 不仅能整合多种遗传和代谢途径的合成工程, 还能加速化学药物合成<sup>[69]</sup>。然而, 无细胞蛋白质表达系统还面临以下几方面问题: 首先, 无细胞真核蛋白质合成系统还需继续探索生物材料, 实现商业化和工业化; 其次, 大多数CFPS的研究追求提高蛋白质表达量, 提高蛋白质的质量并坚持高产量的“双高”模式将成为

工业生产的关键问题; 最后, CFPS是研究非模式、生长缓慢和受环境干扰大的宿主生物过程的重要技术, 但CFPS结果的重复性仍需要改善。综上, CFPS为阐明遗传密码提供了巨大帮助, 其技术不断革新, 发展迅速且应用领域不断扩大, CFPS也将复杂的合成生物学与视觉感官反应联系在一起, 能通过可视化的方式快速确定实验结果。此外, CFPS合成重组药物蛋白质的表达量达到了mL级, 且在病毒和细菌检测方面取得重要进展, 能快速为各种疾病提供检测方案。

## 参考文献

- [1] Shin J, Jardine P, Noireaux V. Genome replication, synthesis, and assembly of the bacteriophage T7 in a single cell-free reaction. *ACS Synth Biol*, 2012, 1(9): 408-413
- [2] Schweet R, Lamfrom H, Allen E. The synthesis of hemoglobin in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, 44(10): 1029-1035
- [3] Nevin DE, Pratt JM. A coupled *in vitro* transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett*, 1991, 291(2): 259-263
- [4] Garenne D, Noireaux V. Cell-free transcription-translation: engineering biology from the nanometer to the millimeter scale. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 58: 19-27
- [5] 刘永祥, 陈思远, 张逸婧, 等. 麦胚无细胞蛋白合成系统研究进展. *食品工业科技*, 2015, 36(17): 379-383
- [6] Stark JC, Jaroentomeechai T, Moeller TD, et al. On-demand biomanufacturing of protective conjugate vaccines. *Sci Adv*, 2021, 7(6): 9444
- [7] Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*, 2000, 246(1-2): 321-330
- [8] 肖世峰, 许娜, 姚林芳, 等. 蓖麻毒素A链在麦胚无细胞系统中的表达. *中国兽医学报*, 2015, 35(11): 1804-1808
- [9] Davies JW, Kaesberg P. Translation of virus mRNA: protein synthesis directed by several virus RNAs in a cell-free extract from wheat germ. *J Gen Virol*, 1974, 25(1): 11-20
- [10] Stech M, Quast RB, Sachse R, et al. A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96635
- [11] 刘阳, 郭小翠, 耿金慧, 等. 体外合成生物学: 无细胞蛋白合成系统研究进展. *科学通报*, 2017, 62(33): 3851-3860
- [12] Silverman AD, Karim AS, Jewett MC. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(3): 151-170

- [13] Garamella J, Marshall R, Rustad M, et al. The all *E. coli* TX-TL toolbox 2.0: a platform for cell-free synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(4): 344-355
- [14] Gräwe A, Dreyer A, Vornholt T, et al. A paper-based, cell-free biosensor system for the detection of heavy metals and date rape drugs. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0210940
- [15] Des Soye BJ, Gerbasi VR, Thomas PM, et al. A highly productive, one-pot cell-free protein synthesis platform based on genomically recoded *Escherichia coli*. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(12): 1743-1754.e9
- [16] Levine MZ, Gregorio NE, Jewett MC, et al. *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis: protocols for a robust, flexible, and accessible platform technology. *J Vis Exp*, 2019, 144: 58882
- [17] Gagoski D, Polinkovsky ME, Mureev S, et al. Performance benchmarking of four cell-free protein expression systems. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(2): 292-300
- [18] 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. *食品科学*, 2011, 32(3): 281-285
- [19] 李正哲, 李力, 李杏君, 等. 麦胚无细胞蛋白合成系统表达人成纤维细胞生长因子21蛋白的研究. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(12): 4964-4965
- [20] Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nat Protoc*, 2010, 5(2): 227-238
- [21] 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
- [22] Schweet R, Lamfrom H, Allen E. The synthesis of hemoglobin in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, 44(10): 1029-1035
- [23] Anastasina M, Terenin I, Butcher SJ, et al. A technique to increase protein yield in a rabbit reticulocyte lysate translation system. *Biotechniques*, 2014, 56(1): 36-39
- [24] Rol-Moreno J, Kuhn L, Ma RS, et al. Grad-cryo-EM: tool to isolate translation initiation complexes from rabbit reticulocyte lysate suitable for structural studies. *Methods Mol Biol*, 2020, 329-339
- [25] 雷道赞, 谢松辉, 刘莉, 等. 蛋白激酶C- $\theta$ 在吗啡诱导Th2细胞分化中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2020, 36(6): 579-583
- [26] Yamaji H, Hirakawa D, Tagai SI, et al. Production of protein kinase C- $\delta$  by the baculovirus-insect cell system in serum-supplemented and serum-free media. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(2): 185-187
- [27] Käßer L, Harnischfeger J, Salzig D, et al. The effect of different insect cell culture media on the efficiency of protein production by *Spodoptera frugiperda* cells. *Electron J Biotechnol*, 2022, 56: 54-64
- [28] Ezure T, Suzuki T, Higashide S, et al. Cell-free protein synthesis system prepared from insect cells by freeze-thawing. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(6): 1570-1577
- [29] Ezure T, Suzuki T, Shikata M, et al. Development of an insect cell-free system. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11(3): 279-284
- [30] Rothblatt JA, Meyer DI. Secretion in yeast: translocation and glycosylation of prepro- $\alpha$ -factor *in vitro* can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. *EMBO J*, 1986, 5(5): 1031-1036
- [31] Sullivan CJ, Pendleton ED, Sasmor HH, et al. A cell-free expression and purification process for rapid production of protein biologics. *Biotechnol J*, 2016, 11(2): 238-248
- [32] Schoborg JA, Clark LG, Choudhury A, et al. Yeast knockout library allows for efficient testing of genomic mutations for cell-free protein synthesis. *Synth Syst Biotechnol*, 2016, 1(1): 2-6
- [33] Hodgman CE, Jewett MC. Optimized extract preparation methods and reaction conditions for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(10): 2643-2654
- [34] Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(3): 150-156
- [35] Ganoza MC, Cunningham C, Green RM. Isolation and point of action of a factor from *Escherichia coli* required to reconstruct translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(6): 1648-1652
- [36] Kim DM, Kigawa T, Choi CY, et al. A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 2010, 239(3): 881-886
- [37] Kuruma Y, Ueda T. The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins. *Nat Protoc*, 2015, 10(9): 1328-1344
- [38] Spice AJ, Aw R, Polizzi KM. Cell-free protein synthesis using *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol*, 2022, 2433: 75-88
- [39] Li J, Wang H, Jewett MC. Expanding the palette of *streptomyces*-based cell-free protein synthesis systems with enhanced yields. *Biochem Eng J*, 2018, 130: 29-33
- [40] Kwon YC, Jewett MC. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 8663
- [41] Zhang L, Liu WQ, Li J. Establishing a eukaryotic *Pichia pastoris* cell-free protein synthesis system. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 536
- [42] Fujiwara K, Doi N. Biochemical preparation of cell extract for cell-free protein synthesis without physical disruption. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154614
- [43] Kobatake E, Ebisawa A, Asaka O, et al. Stabilization and translation of immobilized mRNA on latex beads for cell-free protein synthesis system. *Appl Biochem Biotechnol*,

- 1999, 76(3): 217-228
- [44] 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
- [45] Thompson SR. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol*, 2012, 20(11): 558-566
- [46] Hodgman CE, Jewett MC. Characterizing IGR IRES-mediated translation initiation for use in yeast cell-free protein synthesis. *N Biotechnol*, 2014, 31(5): 499-505
- [47] Zagore LL, Sweet TJ, Hannigan MM, et al. DAZL regulates germ cell survival through a network of poly-a-proximal mRNA interactions. *Cell Rep*, 2018, 25(5): 1225-1240.e6
- [48] Kim HC, Kim TW, Kim DM. Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. *Process Biochem*, 2011, 46(6): 1366-1369
- [49] Karim AS, Rasor BJ, Jewett MC. Enhancing control of cell-free metabolism through pH modulation. *Synth Syst Biotechnol*, 2020, 5(1): 1
- [50] Miguez AM, Mcnerney MP, Styczynski MP. Metabolic profiling of *Escherichia coli*-based cell-free expression systems for process optimization. *Ind Eng Chem Res*, 2019, 58(50): 1-56
- [51] Zhang Y, Huang Q, Deng Z, et al. Enhancing the efficiency of cell-free protein synthesis system by systematic titration of transcription and translation components. *Biochem Eng J*, 2018, 138: 47-53
- [52] Cai Q, Hanson JA, Steiner AR, et al. A simplified and robust protocol for immunoglobulin expression in *E. coli* cell-free protein synthesis systems. *Biotechnol Prog*, 2015, 31(3): 823-831
- [53] Kim TW, Kim HC, Oh IS, et al. A highly efficient and economical cell-free protein synthesis system using the S12 extract of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 13(4): 464-469
- [54] Surribas A, Resina D, Ferrer P, et al. Rivo-flavin may interfere with on-line monitoring of secreted green fluorescence protein fusion proteins in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 2007, 6(1): 1-7
- [55] Roy R, Jan R, Joshi U, et al. Functionalization of Biopolymer based nanofibers with clay minerals as nanofillers: promising material for antibacterial applications. *J Polym Res*, 2022, 29(4): 116
- [56] 孙琦. 材料辅助优化无细胞蛋白质表达[D]. 北京: 中国石油大学, 2019: 32-71
- [57] Burdick JA, Murphy WL. Moving from static to dynamic complexity in hydrogel design. *Nat Commun*, 2012, 3(1): 1-8
- [58] Lian X, Fang Y, Joseph E, et al. Enzyme-MOF (metal-organic framework) composites. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(11): 3386-3401
- [59] Zhang P, Wang J, Ding X, et al. Exploration of the tolerance ability of a cell-free biosynthesis system to toxic substances. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 189(4): 1096-1107
- [60] Hernández-Sámamo AC, Falcón A, Zamudio F, et al. A short framework-III (mini-M-2) conotoxin from the venom of a vermivorous species, *Conus archon*, inhibits human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Peptides*, 2022, 153: 170785
- [61] 梁雅婷, 李梦, 姚戈, 等. 基于无细胞蛋白合成系统体外合成芋螺毒素 $\mu$ -PA. *军事医学*, 2021(2): 81-84
- [62] Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 5(12): 939-951
- [63] Serwer P. Restoring logic and data to phage-cures for infectious disease. *AIMS Microbiol*, 2017, 3(4): 706-712
- [64] 夏安越, 徐欢, 钟秋, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌噬菌体 Abp1 毒力蛋白穿孔素的无细胞融合表达. *军事医学*, 2019, 43(4): 274-281
- [65] Kanoi BN, Nagaoka H, Morita M, et al. Leveraging the wheat germ cell-free protein synthesis system to accelerate malaria vaccine development. *Parasitol Int*, 2020, 80: 102224
- [66] Yang J, Kanter G, Voloshin A, et al. Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 89(5): 503-511
- [67] Endo Y. Development of a cell-free protein synthesis system for practical use. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2021, 97(5): 261-276
- [68] Takahashi MK, Tan X, Dy AJ, et al. A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3347
- [69] Dondapati SK, Stech M, Zemella A, et al. Cell-free protein synthesis: a promising option for future drug development. *BioDrugs*, 2020, 34(3): 327-348