PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2021，48（2）：121~134
www.pibb.ac.cn

人造细胞内蛋白质合成的研究进展*

赵晶晶　王雪靖　穆　韡**　韩晓军**
（哈尔滨工业大学化工与化学学院，城市水资源与水环境国家重点实验室，哈尔滨 150001）

摘要　无细胞蛋白质合成（cell-free protein synthesis，CFPS）是一种在体外快速合成目标蛋白质的方法，通过构建含有CFPS系统的人造细胞，能够实现蛋白质的高通量表达和功能性膜蛋白的体外重构. 本文详细综述了4种CFPS系统（包括大肠杆菌裂解液、兔网织红细胞裂解液、小麦胚芽提取物、酵母提取物）的适用范围和优缺点，总结了基于CFPS系统构建的人造细胞体系内蛋白质合成的研究现状，以及该领域面临的挑战及未来的发展方向.

关键词　无细胞蛋白质合成系统，磷脂囊泡类细胞结构，聚合物囊泡类细胞结构，蛋白质体类细胞结构
中图分类号　Q2，Q5，Q10　　**DOI**：10.16476/j.pibb.2020.0163

合成生物学是通过设计和构建新的半合成系统来对现有生物系统进行重新设计和组装，或者实现生物系统无法执行的新功能的学科，涉及分子生物学、化学、物理学、数学、工程学和纳米技术等学科，目的是更详细地了解生物学的基本过程，通过科学的实验方法去探索生命的本质[1-2]. 生命系统的复杂性使体外模拟生命活动变得十分困难，所以研究者们广泛采用构建人造细胞的方法来研究生命的运行机制. 人造细胞需要具备的基本生命特征为细胞的区室化、新陈代谢、生长和分裂、适应性和流动性等[3]. 科学家们通过在体外构建功能化的人造细胞来模拟真实细胞的结构与功能[4]，以进一步了解生命的本质.

蛋白质作为构成生命体的基本成分受到科学家的广泛关注，在体外实现蛋白质的合成不仅有助于探索生命的奥秘，而且有助于药物的开发[5]. 膜蛋白广泛分布在生物膜中，是蛋白质家族中非常重要的成员[6]，它的多跨膜结构域是许多药物的靶标[7]，如G蛋白偶联受体和离子通道蛋白等. 蛋白质的翻译后修饰（protein translational modifications，PTMs）是蛋白质合成领域的研究热点[8]，其主要形式是蛋白质的糖基化，50%的人类蛋白质都是通过糖基化[9]修饰来实现蛋白质的功能. 目前，合成蛋白质的方法主要有化学合成法[10]和生物合成法[11]. 化学合成法是在水溶液中将两个肽段进行化学选择性连接. 化学连接法是最常用的方法，已被广泛应用于多种蛋白质的合成中，如糖基化蛋白、脂基化蛋白和磷酸化蛋白等，但此方法不能满足多氨基酸残基蛋白质的合成需求. 酰肼片段连接法的出现弥补了这一不足，可实现300多个残基的蛋白质合成[12-16]. 生物合成法是由基因表达调控的蛋白质合成过程[17]. 无细胞蛋白质合成（cell-free protein synthesis，CFPS）作为典型的生物合成法，是一种快速且能高通量表达目标蛋白质的技术，以外源DNA或mRNA为模板，在细胞裂解液提供多种酶的作用下通过补充底物和能量物质来实现蛋白质的体外合成[18-20]. 目前CFPS系统主要有大肠杆菌裂解液、兔网织红细胞裂解液、小麦胚芽提取物、酵母提取物4种体系.

人造细胞是研究生命起源[21-22]、药物递送[23-24]等方面必不可少的工具，可以通过包封生物活性物质（如DNA、RNA和酶等）实现反应来模拟真实细胞特定的功能[25-26]，如利用CFPS系统在人造细胞内部表达多种蛋白质. 将CFPS系统载入人造细胞内，通过DNA质粒转录形成mRNA，再由mRNA翻译成肽链，由肽链折叠最终表达合

* 国家自然科学基金（21773050，21929401）和黑龙江省杰出青年科学基金（JC2018003）资助项目.
** 通讯联系人.
Tel：0451-86413708
穆韡. E-mail：muwei@hit.edu.cn
韩晓军. E-mail：hanxiaojun@hit.edu.cn
收稿日期：2020-05-31，接受日期：2020-07-22

成目标蛋白质（图1）. 本文将着重阐述CFPS的种类及其适用范围，以及基于CFPS系统在多种人造细胞内合成蛋白质的研究进展.

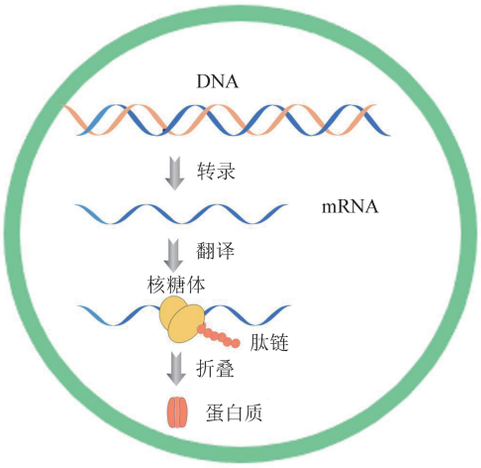

Fig. 1　Schematic of protein expression by CFPS inside artificial cells

图1　人造细胞内部利用CFPS系统表达蛋白质示意图

1　CFPS系统的分类

1.1　大肠杆菌裂解液

最初，无细胞蛋白质合成系统来源于大肠杆菌裂解液[27]，由大肠杆菌粗提物（体积分数33%）和含有营养物质的反应缓冲液（66%）组成. 粗提物的制备通常使用 *Escherichia coli* BL21 Rosetta2菌株[28]. 这种体系可以提高蛋白质的产量，尤其可以大规模、高通量地表达毒性蛋白. 蛋白质产量与反应体系的寿命有着直接的联系，因此科学家们提出很多改进措施来提高蛋白质产量，例如去除毒性副产物、优化能量再生体系、改进翻译组分等. 可以通过过滤来除去毒性副产物如无机磷酸盐[29]等. 由于裂解液中的磷酸酶会导致磷酸烯醇丙酮酸（PEP，磷酸盐分解产物）快速磷酸化，消耗能量降低合成效率，因此优化能量再生体系十分重要. 能量再生主要是通过加入能源物质来实现，高能磷酸盐[30]可作为主要能源来实现能量再生，葡萄糖-6-磷酸盐[31]、果糖[32]可作为次要能源来实现能量再生. 次要能源加入所导致的生成的蛋白质产量要低于主要能源. 翻译组分可通过纯化氨酰基-tRNAs、氨酰基-tRNA合成酶和翻译因子等来改进. 由于大肠杆菌裂解液中存在与表达蛋白质无关的大分子物质如蛋白酶和核酸酶等，这些组分会抑制蛋白质的合成. 通过提取和纯化大肠杆菌有关表达蛋白的翻译因子和氨酰基-tRNA合成酶并将其在体外重组可以减少mRNA和蛋白质的无效降解，提高蛋白质产量.

PURE（protein synthesis using recombinant elements）系统就是由大肠杆菌完全纯化的重组原件系统构成的，包括：启动子（IF1、IF2、IF3）、延伸子（EF-G、EF-Tu、EF-Ts）、终止子（RF1、RF3、RRF）、氨酰基-tRNA合成酶（aminoacyl-tRNA synthetase，ARSs）、甲硫氨酰-tRNA转化酶（methionyl -tRNA invertase，MTF）、T7 RNA聚合酶、核糖体、tRNA、NTPs、磷酸肌酸、10-甲酰基-5,6,7,8-四氢叶酸、20种氨基酸、肌酸激酶、肌激酶、二磷酸核苷激酶和焦磷酸酶等组分. 利用PURE系统在体外表达蛋白质时，需将质粒直接或间接加入混有转录、翻译组分的PURE反应液中，并置于37℃下培养2 h左右，通过启动子诱导可实现蛋白质的表达. 与原核细胞表达系统相比，PURE系统表达蛋白质具有较多优势，如时间短、产率高（高达200 mg/L）、纯度高、可实现胞内系统难以表达的蛋白质（如毒性蛋白）等. 但功能性蛋白的翻译很难被进一步修饰，这使得该系统的应用受到了限制. 研究者们认为这种表达蛋白质的“精简”系统不适于复杂蛋白质的表达，这些复杂蛋白质的表达需采用初提细胞裂解液体系[33].

基于大肠杆菌裂解液的CFPS系统已越来越成熟，该系统菌株培养周期短，裂解液制备简单，能够高通量地表达蛋白质. 该系统也有一定的缺点，如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[34-35]（表1）.

1.2　兔网织红细胞裂解液

兔网织红细胞裂解液是从贫血的兔子血液中提取获得的，通过给兔子连续几天注射乙酰苯肼使其产生急性贫血症状，产生大量网织红细胞（一种未完全成熟的红细胞）. 取耳中静脉血液通过低速离心获得网织红细胞，再高速离心来裂解网织红细胞. 在网织红细胞裂解液中加入氯高铁血红素（氯高铁血红素是起始因子CIF-2抑制物的强阻遏剂）、$CaCl_2$、微球菌核酸酶（破坏内源mRNA）、磷酸肌酸激酶（生成能量）等混匀并保存于−70℃. 最初，兔网织红细胞裂解液大多被用来研究真核细胞内的蛋白质翻译步骤，之后发展为可以直接表达目标蛋白质的系统[36].

兔网织红细胞裂解液是一种哺乳动物系统，制

备过程繁琐，蛋白质产量低. 微球菌核酸酶是一种核酸内切酶，它可以消除内源性mRNA的单链核酸，这对于功能活跃的膜蛋白合成十分重要[34]. 但兔网织红细胞裂解液中没有这种内源性核酸酶，需要额外补充才能实现跨膜蛋白的表达（表1）. 目前，该系统主要应用于蛋白质微阵列技术、蛋白质分子间相互作用研究[37-38]以及筛选技术等.

1.3　小麦胚芽提取物

小麦胚芽提取物是在液氮条件下将洗净的胚芽颗粒研磨压碎所制得的，是一种比较成熟的真核生物系统. 通过调整镁离子、钾离子、氨基酸的浓度、优化能量再生体系可以提高蛋白质的产量. 这种系统与大肠杆菌裂解液相比制备成本更昂贵，因为胚乳中核酸酶和蛋白酶的抑制效应，需要后期很多复杂的操作来消除这种抑制效应[39]. 由于提取物在制备过程中会对酶活性产生影响[40]，需要额外补充反应底物分子才能实现复杂蛋白质的表达.

小麦胚芽提取物能够高通量地合成多种复杂蛋白质，如含二硫键的蛋白质、可溶性蛋白等，但制备成本高，没有内源性膜结构，而且与原核系统相比合成的蛋白质产量低（表1）. 目前该系统在蛋白质筛选、工程和分析等方面都有应用，是比较完善的真核生物系统.

1.4　酵母提取物

酵母粗提物一般选用酿酒酵母进行制备[41]，将酿酒酵母通过离心使细胞沉淀，用甘露醇缓冲液洗涤培养. 之后再用甘露醇缓冲液洗涤3次，去除多余的培养基，将细胞沉淀和裂解缓冲液用玻璃珠破碎仪或均质器进行细胞裂解. 随后裂解物通过透析或快速蛋白液相色谱（fast protein liquid chromatography，FPLC）进行纯化，液氮环境下快速冷冻，并置于−80℃下保存.

酿酒酵母提取物系统制备方法简单，能够实现如蛋白糖基化的翻译后修饰和蛋白质的正确折叠，但难以实现哺乳动物内复杂的翻译后修饰，且蛋白质产量低（表1）. 通过优化细胞培养条件[41-42]、提取物的制备[43]、底物供应和去除副产物[44]等方法可以提高合成蛋白质的产量. 利用成本较低的葡萄糖磷酸盐作为能源物质可实现能量再生. 该系统的提出解决了真核系统制备过程复杂、成本昂贵等问题，若进一步优化在将来有可能成为大规模合成蛋白质的工业化生产平台[45].

Table 1　Comparison of the *pros* and *cons* of four CFPS systems [25, 41–42, 45–49] and summary of proteins that can be synthesized

表1　4种CFPS系统优缺点对比[25, 41–42, 45–49]及可合成的蛋白质种类总结

系统	优点	缺点	可合成的蛋白质种类
大肠杆菌裂解液	菌株生长周期短，易于培养，裂解液制备过程简单； 能高通量表达蛋白质；成本低； 系统完善	有限的翻译后修饰； 无内源性膜结构整合膜蛋白； 复杂蛋白质不能实现正确折叠	荧光标记类：GFP[50-68]等； 物质转运类：αHL[69-71]等； 信号传导类：GPCRs[72]等； 代谢催化类：二氢叶酸还原酶（DHFR）[27, 73-74]等； 细胞分裂类：FtsZ、FtsA、ZipA[75-76]等
兔网织红细胞裂解液	比较完善的哺乳动物系统	蛋白质产量低； 需额外补充微球菌核酸酶才能实现蛋白质合成； 裂解液制备过程繁琐	荧光标记类：GFP[77-78]； 代谢催化酶类：功能性海肾萤光素酶（Rluc）[79]； 物质转运类：Cx43-EGFP[80]
小麦胚芽提取物	能够高通量合成复杂蛋白质； 可合成二硫键桥连的蛋白质； 能正确折叠多种类型蛋白质，如可溶性蛋白质	制备成本高； 没有内源性膜结构； 较原核生物系统蛋白质合成产量低	荧光标记类：GFP[48]； 物质转运类：拟南芥磷酸转运蛋白（AtPPT1）[81]等； 光复合物类：光系统II的捕光色素蛋白复合体（LHCII proteins）[82]； 代谢催化类蛋白：细胞色素b5（cytochrome b5）[83]
酵母提取物	可以实现如糖基化的翻译后修饰； 细胞繁殖快，易于培养，裂解液制备过程简单	蛋白质产量低； 不能实现哺乳动物复杂的翻译后修饰	代谢催化类：Protein A（特异性地与IgG的Fc区特异性结合，是翻译过程地的功能蛋白）

表1详细地对比了4种CFPS系统的优缺点，并总结了各体系合成的蛋白质种类，具体表达的蛋白质种类将在下一部分详细描述. 大肠杆菌裂解液是一种比较完善的原核CFPS系统，可以实现蛋白质的高通量表达，但在功能性蛋白的翻译后修饰方面有一定的局限性. 兔网织红细胞裂解液是基于哺乳动物系统研发的真核蛋白质合成平台，需要额外补充微球菌核酸酶才能实现功能性蛋白质的表达. 小麦胚芽提取物是较完善的真核系统，适合于高通量复杂蛋白质的合成，但是制备成本高使其大规模合成受到限制. 酵母提取物可以实现蛋白质的翻译后修饰，而且制备过程简单，但是产量低. 目前研究者们大多还是采用大肠杆菌裂解液尤其是PURE系统来实现蛋白质的合成.

2 基于CFPS系统表达蛋白质的人造细胞

人造细胞是具有部分细胞功能的、人为构建的类细胞结构. 从构建基元角度可分为磷脂囊泡类细胞结构、聚合物囊泡类细胞结构、蛋白质体类细胞结构、液滴和凝胶类细胞结构. 人造细胞的概念起源于20世纪90年代初期. Oberholzer等[84]在磷脂囊泡内部实现了遗传信息载体DNA分子的聚合酶链式反应. 近30年来，该领域取得了长足发展. 该领域的成果有助于理解细胞的运行机制. 目前人造细胞已经能够模拟细胞的代谢[85]、生长[86]、分裂[87]等功能. 持续供能的代谢模拟、天然磷脂合成参与的繁殖等细胞功能的模拟是本领域的巨大挑战. 人造细胞内蛋白质的表达对于解决上述挑战具有重要意义.

2.1 磷脂囊泡类细胞结构

巨型磷脂囊泡（giant unilamellar vesicle，GUV）是由两亲性的磷脂分子自组装形成尺寸大于1 μm，内外都是水相的泡状结构. 可以通过电形成法[88-93]、水合法[94]或乳液法等方法制备得到GUV. GUV的结构与膜组分接近真实细胞，在其内部合成蛋白质，可以更好地模拟真实细胞. 荧光标记类蛋白是在GUV内合成最多的一类蛋白质，如绿色荧光蛋白（GFP）[50-64，95]、黄色荧光蛋白（YFP、mVenus）[51，96-97]、红色荧光蛋白（RFP、mCherry）[52-53，98]等. 有研究者在磷脂囊泡内通过CFPS系统表达snap-GFP和snap-mCherry[98]，合成的两种荧光蛋白可共价结合到苄基鸟嘌呤（BG）衍生物修饰的磷脂膜上（snap-GFP结合至膜外叶，snap-mCherry结合至膜内叶），从而实现不对称磷脂膜结构的构建（图2a）. 不对称的磷脂膜结构更加接近于真实细胞的膜结构. 除了合成荧光标记类蛋白，在磷脂囊泡内还能实现有特定功能蛋白质的表达，如物质转运类蛋白[51，65，69-70，81，99-101]、信号传导类蛋白[72]、代谢催化酶类蛋白[27，73]以及分裂类蛋白[75-76，102]. 物质转运类蛋白如孔道蛋白α溶血素[70]已在磷脂囊泡内利用CFPS体系成功表达出来，经自组装到磷脂膜形成孔通道结构，可使内部的葡萄糖分子扩散到囊泡外部，进一步发生反应. 信号传导类蛋白如G蛋白偶联sfGFP-CX3CR1[72]，也可实现在磷脂囊泡内的合成，通过自组装到磷脂膜表面（图2b），具有膜定位功能. 代谢催化类蛋白如3-磷酸甘油酰基转移酶（GPAT）和溶血磷脂酸酰基转移酶（LPAAT）[73]也实现了GUV内的成功表达，以上两种酶可催化3-磷酸甘油生成二硬脂酰基磷脂酸（1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate，DOPA），为磷脂囊泡生长提供膜原料（图2c）. 此外，与细胞分裂相关的蛋白FtsZ（图2d *d1*）、FtsA（图2d *d2*）和ZipA（图2d *d3*）[76]也可在GUV内实现成功表达. 蛋白FtsA或ZipA可与FtsZ蛋白发生聚合引起细胞分裂，所以将蛋白FtsZ和FtsA（图2d *d4*）、FtsZ和ZipA（图2d *d5*）或FtsZ1和ZipA（图2d *d6*）在GUV内共表达可诱导囊泡发生形变行为.

目前利用CFPS系统在GUV内合成蛋白质的研究中，大多采用大肠杆菌裂解液PURE系统来实现蛋白质的合成，只有少部分利用小麦胚芽提取物来实现功能性蛋白质的合成，如拟南芥磷酸转运蛋白（AtPPT1）[81]和α-溶血素（αHL-eGFP）[51].

2.2 聚合物囊泡类细胞结构

两亲性的嵌段聚合物分子在水溶性溶液中能够发生一定程度的聚集，形成胶束或囊泡结构[103]，其中聚合物囊泡具有类细胞结构，而且比磷脂囊泡更稳定. 国内外研究者们在聚合物囊泡中也实现了蛋白质的合成，荧光标记类蛋白如GFP[77，104-107]、mCherry[107-108]可在聚合物囊泡中合成. 在非结晶高透明的含氟聚合物（CYTOP）囊泡内利用CFPS体系可合成GFP[107]，随着时间的延长囊泡内表达的GFP量越多（图3a）. 除了荧光标记类蛋白，在聚合物囊泡内部还可以表达某些具有特定功能的蛋

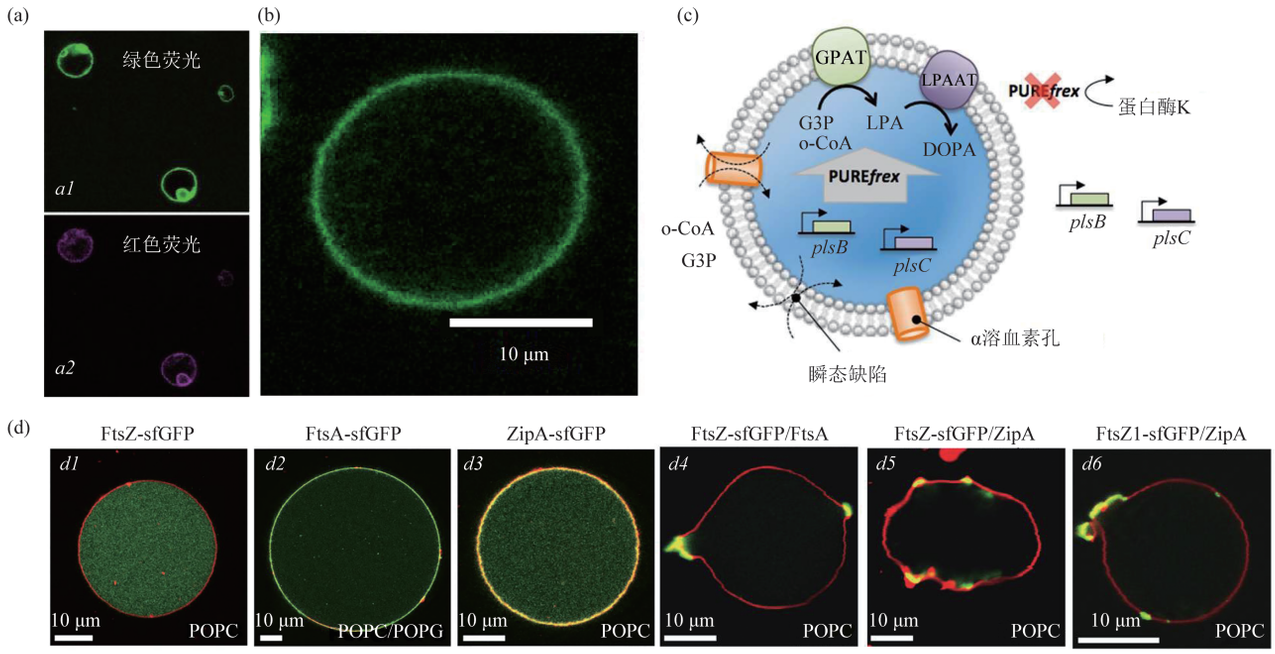

Fig. 2　Protein expression by CFPS inside GUV

图2　GUV内利用CFPS系统的蛋白质表达

（a）GUV内合成荧光标记类蛋白（*a1*：snap-GFP；*a2*：snap-mCherry）的荧光显微镜照片[98]，合成snap-标记的蛋白质可与苄基鸟嘌呤（BG）衍生物修饰的磷脂膜共价结合，*a1*为snap-GFP结合到磷脂膜外小叶的显微镜照片，*a2*为snap-mCherry结合到磷脂膜内小叶的显微镜照片，可实现不对称膜的构建；（b）GUV中合成信号传导类蛋白（G蛋白偶联受体sfGFP-CX3CR1）的荧光显微镜照片[72]；（c）GUV内合成代谢催化酶类蛋白（3-磷酸甘油酰基转移酶、溶血磷脂酸酰基转移酶）的示意图[73]，3-磷酸甘油经GPAT催化生成溶血磷脂酸，溶血磷脂酸经LPAAT催化可生成磷脂DOPA，从而增加膜面积；（d）GUV内合成细胞分裂类蛋白（*d1*：FtsZ；*d2*：FtsA；*d3*：ZipA）以及3种分裂蛋白发生相互作用（*d4*：FtsZ与FtsA在GUV内共表达；*d5*：FtsZ与ZipA在GUV内共表达；*d6*：FtsZ1与ZipA在GUV内共表达）诱导囊泡形变的荧光显微镜照片[76]. GPAT：3-磷酸甘油酰基转移酶；G3P：3-磷酸甘油醛；LPAAT：溶血磷脂酸酰基转移酶；DOPA：1,2-二[顺式-9-十八碳烯酰基]-Sn-甘油-3-磷酯酸；o-CoA：油酰辅酶A；plsB：质粒B；plsC：质粒C；FtsZ：细胞分裂蛋白，是微管相似蛋白；FtsA：细胞分裂蛋白，与肌动蛋白结构相似；ZipA：是FtsZ作用蛋白；POPC：1-棕榈酰基-2-油酰基-甘油-3-磷脂酰胆碱；POPG：1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰甘油.

白质，如信号传导类蛋白（促肾上腺皮质激素释放因子受体CRFR1、CRFR2β[109]）、代谢催化酶类蛋白（氯霉素乙酰转移酶CAT[110]）以及光系统复合蛋白（光系统II的捕光色素蛋白复合体LHCII[82]）等. LHCII在聚合物囊泡内可以成功表达[82]（图3b），合成后经自组装到膜表面形成蛋白质修饰的聚合物囊泡. 为了便于在电镜下观察，该研究利用两种方法对蛋白质进行染色，第一种是利用胶体金对LHCII进行免疫标记（图3b *b1*），这种方法能够快速标记蛋白质，且不会影响蛋白质的活性，第二种是利用四氧化锇（OsO_4还原为OSO_2而使蛋白质呈现黑色）对LHCII进行染色（图3b *b2*），这种标记方法的分辨率不及前一种. 这两种方法会导致囊泡发生轻微变形，可加入海藻糖来增加囊泡稳定性. 后续可通过离心和超滤进行蛋白质的纯化.

目前利用CFPS系统在聚合物囊泡内合成蛋白质的研究中，大多采用大肠杆菌裂解液来合成荧光标记类蛋白（GFP[77, 104, 106]、mCherry[110]）和代谢催化类蛋白（CRFR[109]和CAT[110]），其中GFP[104]和Cherry[108]是用PURE系统合成的. 只有少部分需要利用小麦胚芽提取物来实现功能性复合蛋白的表达，如光系统II的捕光色素蛋白复合体（LHCII[82]）.

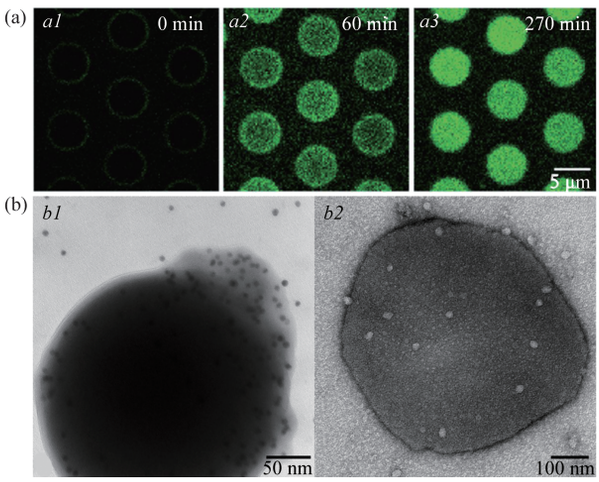

Fig. 3　Protein expression by CFPS inside polymer vesicle

图3　聚合物囊泡内利用CFPS系统的蛋白质表达

（a）不同时间节点下聚合物囊泡内合成GFP的荧光显微镜照片[105]. *a1*：0 min；*a2*：60 min；*a3*：270 min.（b）聚合物囊泡内合成光系统复合蛋白LHCII [82]. LHCII 蛋白是绿色植物中含量最高的捕光复合物，具有很强的疏水性，较难分离，Zapf等通过CFPS系统成功在聚合物囊泡内表达LHCII 蛋白，并在电镜下通过染色得以观察到. *b1*：免疫金标记的LHCII 电镜图；*b2*：经OsO4染色的LHCII 电镜图，白色颗粒表示未染色的LHCII 蛋白.

2.3　蛋白质体类细胞结构

蛋白质体（蛋白质囊泡）是由肽段或蛋白质[111]分子在液滴或脂质体表面通过自组装形成的有膜类细胞结构[112-114]，它具有真实细胞的某些特性如包封作用、膜的选择透过性等. 由于蛋白质体具有较好的生物相容性、生物降解性和生物功能性，可在其内部利用CFPS系统实现蛋白质的合成. 荧光标记类蛋白GFP[115]、mVenus[99]等已在蛋白质体中合成. 通过蛋白质-聚合物分子在油包水液滴表面自组装形成蛋白质体（图4a），在其内可实现eGFP[115]的表达. 除了荧光标记类蛋白，具有特定功能的蛋白质，如代谢催化酶类蛋白（细胞色素b5）[83]、物质转运类蛋白（连接蛋白Cx43-EGFP[18]、水通道膜蛋白AqpZ-sGFP[80]、外壳蛋白OEP24[116]）也可在蛋白质体中表达出来. 通过在GUV内利用CFPS系统合成连接蛋白Cx43-EGFP[18]（图4b）或外壳蛋白OEP24[116]（图4c）直接构建蛋白质体，发挥孔通道的物质转运功能. 豌豆叶绿体外壳蛋白（OEP）是一类高度受控的蛋白质，在物质转运和代谢过程中具有多种功能，OEP包括OEP16、OEP21、OEP24和OEP37，它们在叶绿体新陈代谢中发挥着独特的电生理功能. 在线粒体外膜研究中OEP24是唯一不具有选择性的通道，可作为植物中的一般溶质通道.

因蛋白质体成本高，在其内的蛋白质合成研究较少，有些利用大肠杆菌裂解液来合成荧光标记类蛋白（eGFP[115]、mVenus[99]）和物质转运类蛋白（AqpZ-sGFP[80]），也可利用小麦胚芽提取物合成代谢催化类蛋白（EGFP-b5[83]），还有利用兔网织红细胞裂解液来表达物质转运类蛋白（Cx43-EGFP[80]）. 蛋白质体具有较好的稳定性和多孔结构，因此在药物和生物活性剂的持续储存和释放领域有着较大的应用潜力.

2.4　液滴类细胞结构

微液滴是指两种不相容的溶液（混有表面活性剂）通过机械搅拌、超声或涡旋等方法制备的油包水/水包油乳液[18, 117]，细胞大小的封闭腔室、良好的生物相容性和较好的包封率使其也可作为人造细胞模型. 在其内部也可利用CFPS系统实现蛋白质的表达. 荧光标记类蛋白如GFP[78, 118-120]、RFP[121]、mVenus[122]、YFP[123-124]等已在微液滴中表达出来. 通过在液滴内部载入分别含有转录单元和翻译单元的微凝胶[122]可实现mVenus蛋白的合成（图5a），转录合成的mRNA会扩散到翻译单元的微凝胶内部成功介导mVenus蛋白的表达. 也可利用荧光探针对转录合成的mRNA进行荧光标记，便于监测蛋白质的合成过程（图5b）. 除了荧光标记类蛋白，在液滴内部还可以合成代谢催化酶类蛋白（谷胱甘肽S-转移酶GST[125]、乳糖通透酶LacY[126]、β葡萄糖苷酸酶[127]）、膜骨架类蛋白MreB[121]、物质转运类蛋白（钾通道蛋白[117]、α溶血素AH[71, 128]、多药转运蛋白EmrE[129]）等. 在微液滴内部可合成物质转运类蛋白如α-溶血素[71]（图5c），在微液滴间的脂双层界面可实现孔蛋白的自组装，进而实现物质的跨膜转运. 膜蛋白因结构疏水容易发生折叠和聚集，而且在表达过程中会对细胞产生毒性. 为了实现膜蛋白的高通量表达，在液滴内部可利用CFPS体系合成单跨膜蛋白（ssMPs）（图5d），油滴不仅可以为单跨膜蛋白提供疏水性环境，而且能与其他细胞或组织发生信息交流[117].

微液滴的包封率较高，可提供拥挤的细胞环境合成蛋白质，其内部的区室化结构有助于人们更好地理解转录和翻译机制. 微液滴内部大多采用大肠杆菌裂解液系统来合成荧光标记类蛋白质（RFP[121]、GFP[118-119]、mVenus[122]、YFP[123-124]）、

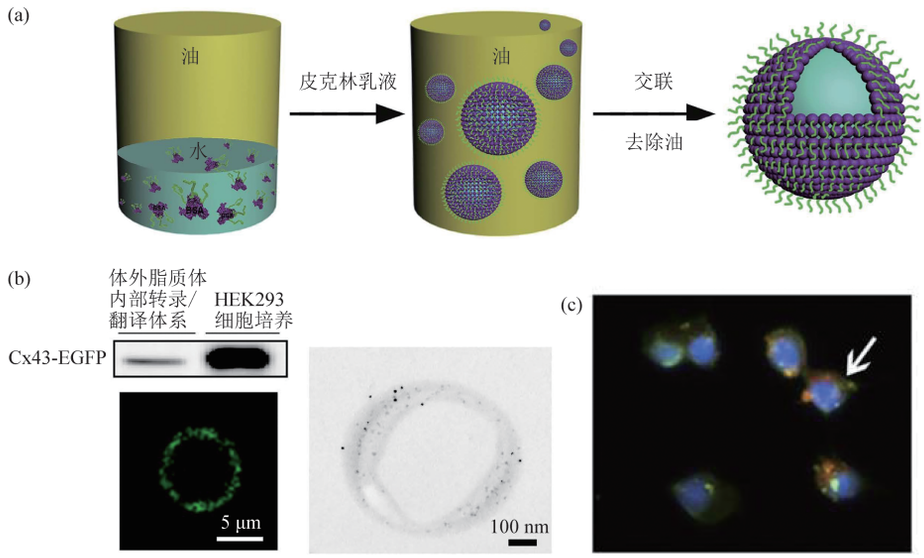

Fig. 4　Protein expression by CFPS inside proteinosome

图4　蛋白质囊泡内利用CFPS系统的蛋白质表达

（a）蛋白质囊泡的制备示意图[115]；（b）合成物质转运类蛋白（Cx43-EGFP）的显微镜照片[80]；（c）合成外壳蛋白（OEP24）的显微镜照片[116]，箭头所指方向即为OEP24蛋白.

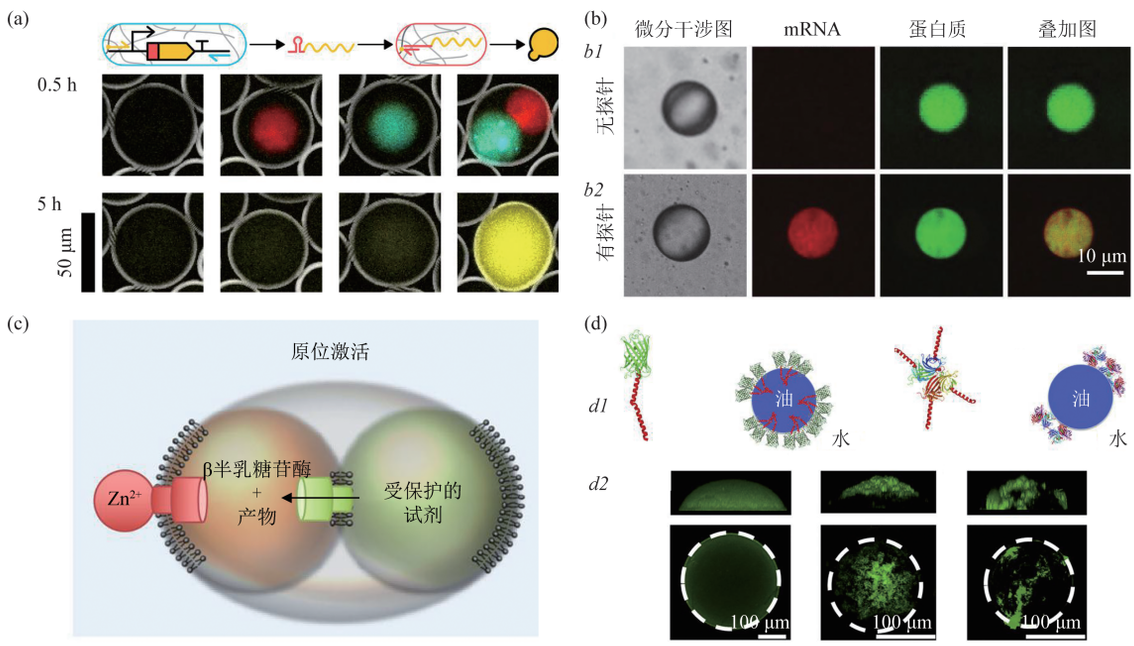

Fig. 5　Protein expression by CFPS inside microdroplets

图5　微液滴内利用CFPS系统的蛋白质表达

（a）微液滴内转录微凝胶触发翻译微凝胶表达mVenus蛋白的显微镜照片[122]，如图所示在蓝色微凝胶内部包封转录单元，合成mRNA后扩散至包封翻译单元的红色微凝胶内部，可实现mVenus黄色荧光蛋白的表达.（b）微液滴内合成荧光标记类蛋白（GFP）显微镜图[120]. *b1*：未加mRNA探针的明场、mRNA、GFP及叠加的显微镜照片；*b2*：有mRNA探针的明场、mRNA、GFP及叠加的显微镜照片.（c）微液滴内合成α溶血素在脂双层界面自组装形成孔通道的示意图[71]. 两个人造细胞可通过合成的孔蛋白通道实现物质转运.（d）微液滴内合成单跨膜蛋白（ssMPs）的显微镜照片[117]. *d1*：油滴内合成ssMPs的示意图；*d2*：油滴内合成ssMPs的显微镜照片.

代谢催化类蛋白（谷胱甘肽S-转移酶GST[125]、乳糖通透酶LacY[126]）和物质转运类蛋白（钾通道蛋白[117]、α溶血素AH[71, 128]、多药转运蛋白EmrE[129]），其中乳糖通透酶LacY[126]、mVenus[122]、RFP[121]和α溶血素AH[71]是用PURE系统合成的. 也有利用兔网织红细胞裂解液来合成GFP[78]的相关研究.

2.5　凝胶类细胞结构

微凝胶大多是采用DNA链或纳米黏土作为交联剂形成交联网状的类细胞结构，能够为蛋白质合成提供一个高通量表达、可循环使用的腔室微环境[130-131]. 在微凝胶内部可以实现荧光标记类蛋白的表达，比如GFP[66, 74, 132-135]、mCherry[107]等. 黏土水凝胶是由黏土纳米盘在离子溶液中自发交联形成的，质粒中的物质可通过扩散进入黏土凝胶中，由于质粒与黏土间的静电作用，质粒可以固定在黏土凝胶中（图6a *a1*），进而可实现凝胶内部GFP的表达[66]（图6a *a2*），这种微凝胶的制备方法简单，通过包封磁性纳米颗粒可实现黏土微凝胶的循环反复使用. DNA水凝胶是由DNA分子通过化学交联或物理缠绕形成. Kahn等[133]通过将基因共价结合到X-DNA支架（DNA连接酶交联DNA形成的凝胶支架结构）形成DNA凝胶（图6b *b1*），在其内部可利用CFPS系统实现GFP的表达（图6b *b2*）. 除了合成荧光标记类蛋白，还有代谢催化酶类蛋白（功能性海肾萤光素酶Rluc[74]、二氢叶酸还原酶DHFR[133]、CAT[79]）的表达.

在微凝胶内利用CFPS系统合成蛋白质大都利用大肠杆菌裂解液系统合成荧光标记类蛋白（GFP[66, 74, 132-135]、mCherry[107]）和代谢催化酶类蛋白（DHFR[132]、CAT[79]），也有报道利用兔网织红细胞裂解液来合成功能性海肾萤光素酶（Rluc）[74].

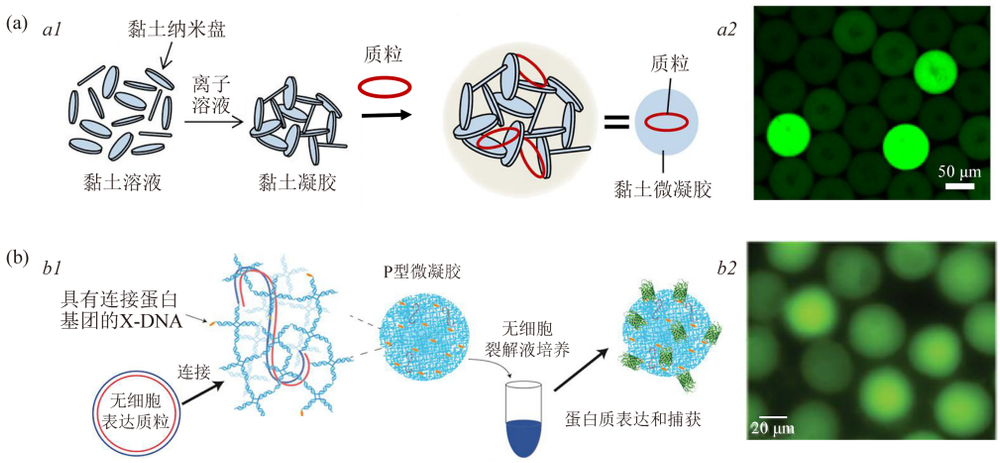

Fig. 6　Protein expression by CFPS inside microgels

图6　微凝胶内利用CFPS系统的蛋白质表达

（a）在黏土微凝胶内合成GFP[66]. *a1*：黏土微凝胶的制备示意图；*a2*：在黏土微凝胶内合成GFP的显微镜照片.（b）在DNA水凝胶内合成GFP[133]. *b1*：DNA微凝胶的制备示意图；*b2*：DNA微凝胶内部合成GFP的显微镜照片.

2.6　其他种类人造细胞

除了以上几种人造细胞可作为合成蛋白质的微反应器（表2），还有报道在凝聚体类细胞结构[136]、胶体囊泡类细胞结构[137]以及纳米微球[67, 138-141]内合成蛋白质等. 凝聚体和胶体囊泡类细胞结构在合成蛋白质方面应用较少，都是利用PURE系统来表达荧光标记类蛋白（GFP[68]和mCherry蛋白[142]）. 在未来这些类细胞结构有可能被用来合成更多种类的蛋白质.

3　结　　论

利用CFPS系统在人造细胞内表达合成蛋白质，可以更好地模拟真实细胞的结构与功能. 目前，在人造细胞内利用CFPS系统合成的蛋白质大多都是利用大肠杆菌裂解液（或PURE系统），这种原核生物系统便宜易得，发展成熟而且方便操控，但蛋白质的翻译后修饰使其应用受到了限制，需要使用真核生物系统如兔网织红细胞裂解液和小

Table 2　Comparison of the advantages and disadvantages of protein expression by CFPS inside artificial cells and a summary of proteins that can be synthesized

表2　CFPS的人造细胞内各自表达蛋白质的优缺点对比及合成蛋白质种类总结

人造细胞	结构单元	优点	缺点	可合成蛋白
磷脂囊泡类细胞结构	磷脂分子	具有和真实细胞相似的结构和组分；良好的生物相容性	极端环境下不稳定	荧光标记类：GFP [27，50-61，63-65]、mCherry [53]、CFP [50-51]、YFP [51，62，97]、mVenus [96]、RFP [52]、BFP [62]； 物质转运类：α-溶血素 [51，69-70]、F1Fo-ATP [81，101]、Cx43-EGFP [65]； 信号传导类：GPCRs [72]； 代谢催化类：DHFR [27]、β-Gal [73]、GPAT 和LPAAT [113]； 细胞分裂类：FtsZ、FtsA、ZipA [76]
聚合物囊泡类细胞结构	嵌段共聚物	增强稳定性	生物相容性差	荧光标记类：GFP [72-73，76]、mCherry [108] 等； 信号传导类：CRFR1 [109]； 代谢催化类：CAT [110]； 光系统复合物类：LHCII [82]
蛋白质体类细胞结构	肽段、蛋白质、磷脂分子	较好的生物相容性和生物降解性	造价高	荧光标记类：mVenus [99] 等； 代谢催化类：EGFP-b5 [83]； 物质转运类：Cx43-EGFP [80]、AqpZ-sGFP [18]、OEP24 [113]
液滴类细胞结构	磷脂分子	包封率高，可提供拥挤的细胞环境	不能很好地模拟活细胞膜的选择渗透性	荧光标记类：GFP [78，118-120]、RFP [121]、mVenus [115]、mYPet [124]、YFP [123]、CFP [123]； 代谢催化类：谷胱甘肽S-转移酶GST [125]、乳糖通透酶LacY [126]、GUS [127]； 膜骨架类：MreB [121]； 物质转运类：钾通道蛋白 [129]、α-溶血素 [71，128]、EmrE [128]）
凝胶类细胞结构	DNA链、黏土	因多孔微结构可延长CFPS使用时间和提高蛋白质产量； 可用于大规模分批或连续生产蛋白质	尺寸不可控	荧光标记类：GFP [66，74，132-134]、mCherry [107]； 代谢催化类：功能性海肾萤光素酶rluc [79，132]、二氢叶酸还原酶DHFR [74]

麦胚芽提取物等实现功能蛋白质的表达. 磷脂囊泡类细胞结构因其组分与结构接近于真实细胞，蛋白质合成的相关研究较多. 聚合物囊泡、蛋白质囊泡的稳定性较好，微凝胶的蛋白质合成产量较高. 各类人造细胞都具有各自不同的特点，应根据实验需求选择合适的实验方案. 构建含有CFPS系统的人造细胞不仅可以帮助人们了解细胞的运行机制，还具有作为生物工厂的工业化应用前景.

参　考　文　献

[1] Yue K, Zhu Y Y, Kai L. Cell-free protein synthesis: chassis toward the minimal cell. Cells, 2019, **8**(4): 315

[2] Zong W, Ma S H, Zhang X N, *et al*. A fissionable artificial eukaryote-like cell model. Journal of the American Chemical Society, 2017, **139**(29): 9955-9960

[3] Schwille P, Spatz J, Landfester K, *et al*. Maxsynbio: avenues towards creating cells from the bottom up. Angewandte Chemie-International Edition, 2018, **57**(41): 13382-13392

[4] Eilenberger C, Spitz S, Bachmann B E M, *et al*. The usual suspects 2019: of chips, droplets, synthesis, and artificial cells. Micromachines, 2019, **10**(5): 285

[5] Shen F, Huang Y C, Tang S, *et al*. Chemical synthesis of integral membrane proteins: methods and applications. Israel Journal of Chemistry, 2011, **51**(8-9): 940-952

[6] Rabilloud T. Membrane proteins ride shotgun - a new mass spectrometry-based approach identifies and characterizes membrane proteins on a large scale. Nature Biotechnology, 2003,

21(5): 508-510

[7] Li J B, Tang S, Zheng J S, *et al*. Removable backbone modification method for the chemical synthesis of membrane proteins. Accounts of Chemical Research, 2017, **50**(5): 1143-1153

[8] Yu B, Morales J F, O'Rourke S M, *et al*. Glycoform and net charge heterogeneity in Gp120 immunogens used in HIV vaccine trials. Plos One, 2012, **7**(8): e43903

[9] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the Swiss-Prot database. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 1999, **1473**(1): 4-8

[10] Johnson E C B, Durek T, Kent S B N. Total chemical synthesis, folding, and assay of a small protein on a water-compatible solid support. Angewandte Chemie-International Edition, 2006, **45**(20): 3283-3287

[11] Lim H J, Lee K H, Kim D M. Rapid determination of effective folding agents by sequential cell-free protein synthesis. Biochemical Engineering Journal, 2018, **138**: 106-110

[12] Wucherpfennig T G, Pattabiraman V R, Limberg F R P, *et al*. Traceless preparation of C-terminal alpha-ketoacids for chemical protein synthesis by alpha-ketoacid-hydroxylamine ligation: Synthesis of sumo2/3. Angewandte Chemie-International Edition, 2014, **53**(45): 12248-12252

[13] Fang G M, Li Y M, Shen F, *et al*. Protein chemical synthesis by ligation of peptide hydrazides. Angewandte Chemie-International Edition, 2011, **50**(33): 7645-7649

[14] Fang G M, Wang J X, Liu L. Convergent chemical synthesis of proteins by ligation of peptide hydrazides. Angewandte Chemie-International Edition, 2012, **51**(41): 10347-10350

[15] Zhang B C, Deng Q, Zuo C, *et al*. Ligation of soluble but unreactive peptide segments in the chemical synthesis of haemophilus influenzae DNA ligase. Angewandte Chemie-International Edition, 2019, **58**(35): 12231-12237

[16] Pan M, Zheng Q Y, Ding S, *et al*. Chemical protein synthesis enabled mechanistic studies on the molecular recognition of K27-linked ubiquitin chains. Angewandte Chemie-International Edition, 2019, **58**(9): 2627-2631

[17] Van Nies P, Westerlaken I, Blanken D, *et al*. Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. Nature Communications, 2018, **9**(1): 1583

[18] Yue K, Trung T N, Zhu Y Y, *et al*. Co-translational insertion of aquaporins into liposome for functional analysis *via* an *E. coli* based cell-free protein synthesis system. Cells, 2019, **8**(11): 1325

[19] Levine M Z, Gregorio N E, Jewett M C, *et al*. *Escherichia coil*-based cell-free protein synthesis: protocols for a robust, flexible, and accessible platform technology. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2019, **144**(11): e58882

[20] Zhang M, Zhao G Y, Dai M X. Research progress and applications of cell-free protein synthesis system. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, **30**(01): 94-99

[21] Zong W, Zhang X N, Li C, *et al*. Thylakoid containing artificial cells for the inhibition investigation of light-driven electron transfer during photosynthesis. Acs Synthetic Biology, 2018, **7**(3): 945-951

[22] Li S B, Wang X J, Mu W, *et al*. Chemical signal communication between two protoorganelles in a lipid-based artificial cell. Analytical Chemistry, 2019, **91**(10): 6859-6864

[23] Wu Y, Manna S, Petrochenko P, *et al*. Coexistence of oil droplets and lipid vesicles in propofol drug products. International Journal of Pharmaceutics, 2020, **577**(9): 118998

[24] Khan S, McCabe J, Hill K, *et al*. Biodegradable hybrid block copolymer - lipid vesicles as potential drug delivery systems. Journal of Colloid and Interface Science, 2020, 562: 418-428

[25] Tinafar A, Jaenes K, Pardee K. Synthetic biology goes cell-free. BMC Biology, 2019, **17**(1): 64

[26] Zhu C T, Li Q C, Dong M D, *et al*. Giant unilamellar vesicle microarrays for cell function study. Analytical Chemistry, 2018, **90**(24): 14363-14367

[27] Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, *et al*. Cell-free translation reconstituted with purified components. Nature Biotechnology, 2001, **19**(8): 751-755

[28] Sun Z Z, Hayes C A, Shin J, *et al*. Protocols for implementing an *Escherichia coli* based Tx-TL cell-free expression system for synthetic biology. Journal of Visualized Experiments, **2013**(79): e50762

[29] Martemyanov K A, Spirin A S, Gudkov A T. Direct expression of PCR products in a cell-free transcription/translation system: Synthesis of antibacterial peptide cecropin. Febs Letters, 1997, **414**(2): 268-270

[30] Kim D M, Swartz J R. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel Atp regeneration system. Biotechnology and Bioengineering, 1999, **66**(3): 180-188

[31] Kim D M, Swartz J R. Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. Biotechnology and Bioengineering, 2001, **74**(4): 309-316

[32] Kim T W, Keum J W, Oh I S, *et al*. An economical and highly productive cell-free protein synthesis system utilizing fructose-1, 6-bisphosphate as an energy source. Journal of Biotechnology, 2007, **130**(4): 389-393

[33] Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, *et al*. Cell-free protein synthesis: pros and cons of prokaryotic and eukaryotic systems . Chembiochem, 2015, **16**(17): 2420-2431

[34] Braun P, LaBaer J. High throughput protein production for functional proteomics. Trends in Biotechnology, 2003, **21**(9): 383-388

[35] Engel A, Winkler F K. 3rd International conference on structure, dynamics and function of proteins in biological membranes. Journal of Structural Biology, 2007, **159**(2): 165-165

[36] Merrick W C. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. Gene, 2004, 332: 1-11

[37] Shao J Y, Irwin A, Hartson S D, *et al*. Functional dissection of Cdc37: characterization of domain structure and amino acid residues critical for protein kinase binding . Biochemistry, 2003, **42**(43): 12577-12588

[38] Niyaz Y, Frenz I, Petersen G, *et al*. Transcriptional stimulation by the DNA binding protein Hap46/Bag-1m involves Hsp70/Hsc70 molecular chaperones. Nucleic Acids Research, 2003, **31**(8): 2209-2216

[39] 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. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(2): 559-564

[40] Harbers M. Wheat germ systems for cell-free protein expression. Febs Letters, 2014, **588**(17): 2762-2773

[41] Choudhury A, Hodgman C E, Anderson M J, *et al*. Evaluating fermentation effects on cell growth and crude extract metabolic activity for improved yeast cell-free protein synthesis. Biochemical Engineering Journal, 2014, **91**: 140-148

[42] Hodgman C E, Jewett M C. Characterizing Igr Ires-mediated translation initiation for use in yeast cell-free protein synthesis. New Biotechnology, 2014, **31**(5): 499-505

[43] Hodgman C E, Jewett M C. Optimized extract preparation methods and reaction conditions for improved yeast cell-free protein synthesis. Biotechnology and Bioengineering, 2013, **110**(10): 2643-2654

[44] Schoborg J A, Hodgman C E, Anderson M J, *et al*. Substrate replenishment and byproduct removal improve yeast cell-free protein synthesis. Biotechnology Journal, 2014, **9**(5): 630-640

[45] Carlson E D, Gan R, Hodgman C E, *et al*. Cell-free protein synthesis: applications come of age. Biotechnology Advances, 2012, **30**(5): 1185-1194

[46] Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. Nature Protocols, 2010, **5**(2): 227-238

[47] Sawasaki T, Kamura N, Matsunaga S, *et al*. *Arabidopsis* Hy5 protein functions as a DNA-binding tag for purification and functional immobilization of proteins on agarose/DNA microplate. Febs Letters, 2008, **582**(2): 221-228

[48] Cho H, Daniel T, Buechler Y J, *et al*. Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(22): 9060-9065

[49] Albayrak C, Swartz J R. Cell-free co-production of an orthogonal transfer RNA activates efficient site-specific non-natural amino acid incorporation. Nucleic Acids Research, 2013, **41**(11): 5949-5963

[50] Nourian Z, Danelon C. Linking genotype and phenotype in protein synthesizing liposomes with external supply of resources. ACS Synthetic Biology, 2013, **2**(4): 186-193

[51] Noireaux V, Libchaber A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**(51): 17669-17674

[52] Elani Y, Law R V, Ces O. Protein synthesis in artificial cells: using compartmentalisation for spatial organisation in vesicle bioreactors. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015, **17**(24): 15534-15537

[53] Caschera F, Noireaux V. Compartmentalization of an all-*E. coli* cell-free expression system for the construction of a minimal cell. Artificial Life, 2016, **22**(2): 185-195

[54] Nomura S, Tsumoto K, Hamada T, *et al*. Gene expression within cell-sized lipid vesicles. Chembiochem, 2003, **4**(11): 1172-1175

[55] Ishikawa K, Sato K, Shima Y, *et al*. Expression of a cascading genetic network within liposomes. FEBS Lett, 2004, **576**(3): 387-390

[56] Murtas G, Kuruma Y, Bianchini P, *et al*. Protein synthesis in liposomes with a minimal set of enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, **363**(1): 12-17

[57] Yamaji K, Kanai T, Nomura S I M, *et al*. Protein synthesis in giant liposomes using the *in vitro* translation system of *Thermococcus kodakaraensis*. IEEE Trans Nanobioscience, 2009, **8**(4): 325-331

[58] Saito H, Kato Y, Le Berre M, *et al*. Time-resolved tracking of a minimum gene expression system reconstituted in giant liposomes. Chembiochem, 2009, **10**(10): 1640-1643

[59] Nishimura K, Matsuura T, Nishimura K, *et al*. Cell-free protein synthesis inside giant unilamellar vesicles analyzed by flow cytometry. Langmuir, 2012, **28**(22): 8426-8432

[60] Nourian Z, Roelofsen W, Danelon C. Triggered gene expression in fed-vesicle microreactors with a multifunctional membrane. Angewandte Chemie-International Edition, 2012, **51**(13): 3114-3118

[61] Hadorn M, Boenzli E, Sorensen K T, *et al*. Defined DNA-mediated assemblies of gene-expressing giant unilamellar vesicles. Langmuir, 2013, **29**(49): 15309-15319

[62] Nishimura K, Tsuru S, Suzuki H, *et al*. Stochasticity in gene expression in a cell-sized compartment. ACS Synthetic Biology, 2015, **4**(5): 566-576

[63] Stano P, D'Aguanno E, Bolz J, *et al*. A remarkable self-organization process as the origin of primitive functional cells. Angewandte Chemie-International Edition, 2013, **52**(50): 13397-13400

[64] Berhanu S, Ueda T, Kuruma Y. Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis. Nature Communications, 2019, **10**(1): 1325

[65] Liu Y J, Hansen G P R, Venancio-Marques A, *et al*. Cell-free preparation of functional and triggerable giant proteoliposomes. Chembiochem, 2013, **14**(17): 2243-2247

[66] Jiao Y, Liu Y, Luo D, *et al*. Microfluidic-assisted fabrication of clay microgels for cell-free protein synthesis. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, **10**(35): 29308-29313

[67] Lim S Y, Kim K O, Kim D M, *et al*. Silica-coated alginate beads for in vitro protein synthesis *via* transcription/translation machinery encapsulation. Journal of Biotechnology, 2009, **143**(3): 183-189

[68] Li M, Green D C, Anderson J L R, *et al*. *In vitro* gene expression and enzyme catalysis in bio-inorganic protocells. Chemical Science, 2011, **2**(9): 1739-1745

[69] Fujii S, Matsuura T, Sunami T, *et al*. Liposome display for *in vitro* selection and evolution of membrane proteins. Nature Protocols, 2014, **9**(7): 1578-1591

[70] Tang T Y D, Cecchi D, Fracasso G, *et al*. Gene-mediated chemical communication in synthetic protocell communities. ACS Synthetic Biology, 2018, **7**(2): 339-346

[71] Booth M J, Cazimoglu I, Bayley H. Controlled deprotection and release of a small molecule from a compartmented synthetic tissue module. Communications Chemistry, 2019, **2**(8): 142

[72] Gessesse B, Nagaike T, Nagata K, *et al*. G-Protein coupled receptor protein synthesis on a lipid bilayer using a reconstituted cell-free protein synthesis system. Life-Basel, 2018, **8**(4): 54

[73] Scott A, Noga M J, de Graaf P, *et al*. Cell-free phospholipid biosynthesis by gene-encoded enzymes reconstituted in liposomes. Plos One, 2016, **11**(10): e0163058

[74] Lee K H, Lee K Y, Byun J Y, *et al*. On-bead expression of recombinant proteins in an agarose gel matrix coated on a glass slide. Lab on a Chip, 2012, **12**(9): 1605-1610

[75] Fanalista F, Birnie A, Maan R, *et al*. Shape and size control of artificial cells for bottom-up biology. ACS Nano, 2019, **13**(5):

5439-5450

[76] Furusato T, Horie F, Matsubayashi H T, *et al*. *De novo* synthesis of basal bacterial cell division proteins Ftsz, Ftsa, and Zipa inside giant vesicles. ACS Synthetic Biology, 2018, **7**(4): 953-961

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

[78] Kato A, Yanagisawa M, Sato Y T, *et al*. Cell-sized confinement in microspheres accelerates the reaction of gene expression. Scientific Reports, 2012, **2**(5): 283

[79] Park N, Kahn J S, Rice E J, *et al*. High-yield cell-free protein production from P-gel. Nature Protocols, 2009, **4**(12): 1759-1770

[80] Kaneda M, Nomura S M, Ichinose S, *et al*. Direct formation of proteo-liposomes by *in vitro* synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes. Biomaterials, 2009, **30**(23-24): 3971-3977

[81] Matthies D, Haberstock S, Joos F, *et al*. Cell-free expression and assembly of Atp synthase. Journal of Molecular Biology, 2011, **413**(3): 593-603

[82] Zapf T, Tan C W D, Reinelt T, *et al*. Synthesis and functional reconstitution of light-harvesting complex II into polymeric membrane architectures. Angewandte Chemie-International Edition, 2015, **54**(49): 14664-14668

[83] Nomura S I M, Kondoh S, Asayama W, *et al*. Direct preparation of giant proteo-liposomes by *in vitro* membrane protein synthesis. Journal of Biotechnology, 2008, **133**(2): 190-195

[84] Oberholzer T, Albrizio M, Luisi P L. Polymerase chain-reaction in liposomes. Chemistry & Biology, 1995, **2**(10): 677-682

[85] Buddingh B C, van Hest J C M. Artificial cells: synthetic compartments with life-like functionality and adaptivity. Accounts of Chemical Research, 2017, **50**(4): 769-777

[86] Hanczyc M M, Fujikawa S M, Szostak J W. Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth, and division. Science, 2003, **302**(5645): 618-622

[87] Miele Y, Medveczky Z, Holl G, *et al*. Self-division of giant vesicles driven by an internal enzymatic reaction. Chemical Science, 2020, **11**(12): 3228-3235

[88] Li Q C, Wang X J, Ma S H, *et al*. Electroformation of giant unilamellar vesicles in saline solution. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2016, **147**: 368-375

[89] Bi H M, Yang B, Wang L, *et al*. Electroformation of giant unilamellar vesicles using interdigitated ITO electrodes. Journal of Materials Chemistry A, 2013, **1**(24): 7125-7130

[90] Bi H M, Fu D G, Wang L, *et al*. Lipid nanotube formation using space-regulated electric field above interdigitated electrodes. ACS Nano, 2014, **8**(4): 3961-3969

[91] Zhu C T, Zhang Y, Wang Y N, *et al*. Point-to-plane nonhomogeneous electric-field-induced simultaneous formation of giant unilamellar vesicles (Guvs) and lipid tubes. Chemistry-a European Journal, 2016, **22**(9): 2906-2909

[92] Zong W, Li Q C, Zhang X A, *et al*. Deformation of giant unilamellar vesicles under osmotic stress. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2018, **172**: 459-463

[93] Jing J, Li Y, Liu J, *et al*. Liposome formation with electroformation method. Progress in Chemistry, 2011, **23**(12): 2598-2606

[94] Zhu T F, Szostak J W. Preparation of large monodisperse vesicles. Plos One, 2009, **4**(4): e5009

[95] Yu W, Sato K, Wakabayashi M, *et al*. Synthesis of functional protein in liposome. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, **92**(6): 590-593

[96] Spencer A C, Torre P, Mansy S S. The encapsulation of cell-free transcription and translation machinery in vesicles for the construction of cellular mimics. Journal of Visualized Experiments, 2013, **80**(7): e51304

[97] van Nies P, Nourian Z, Kok M, *et al*. Unbiased tracking of the progression of mRNA and protein synthesis in bulk and in liposome-confined reactions. Chembiochem, 2013, **14**(15): 1963-1966

[98] Uyeda A, Watanabe T, Hohsaka T, *et al*. Different protein localizations on the inner and outer leaflet of cell-sized liposomes using cell-free protein synthesis. Synthetic Biology, 2018, **3**(1): ysy007

[99] Vogele K, Frank T, Gasser L, *et al*. Towards synthetic cells using peptide-based reaction compartments. Nature Communications, 2018, **9**(1): 3862

[100] Chalmeau J, Monina N, Shin J, *et al*. Alpha-hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2011, **1808**(1): 271-278

[101] Kuruma Y, Ueda T. The pure system for the cell-free synthesis of membrane proteins. Nature Protocols, 2015, **10**(9): 1328-1344

[102] Kuruma Y. Biosynthesis of phosphatidic acid in liposome compartments - toward the self-reproduction of minimal cells. Origins of Life and Evolution of Biospheres, 2007, **37**(4-5): 409-413

[103] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, *et al*. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters, 2013, **8**(1): 102

[104] Cui J H, Wu D, Sun Q, *et al*. A pegda/DNA hybrid hydrogel for cell-free protein synthesis. Frontiers in Chemistry, 2020, **8**: 28

[105] Eto H, Soga N, Franquelim H G, *et al*. Design of sealable custom-shaped cell mimicries based on self assembled monolayers on cytop polymer. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, **11**(24): 21372-21380

[106] Jacobs M L, Boyd M A, Kamat N P. Diblock copolymers enhance folding of a mechanosensitive membrane protein during cell-free expression. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, **116**(10): 4031-4036

[107] Zhou X Y, Wu H, Cui M, *et al*. Long-lived protein expression in hydrogel particles: towards artificial cells. Chemical Science, 2018, **9**(18): 4275-4279

[108] Lai S N, Zhou X Y, Ouyang X F, *et al*. Artificial cells capable of long-lived protein synthesis by using aptamer grafted polymer hydrogel. Acs Synthetic Biology, 2020, **9**(1): 76-83

[109] Klammt C, Perrin M H, Maslennikov I, *et al*. Polymer-based cell-free expression of ligand-binding family B G-protein coupled receptors without detergents. Protein Science, 2011, **20**(6): 1030-1041

[110] Kim H C, Kim T W, Kim D M. Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. Process Biochemistry, 2011, **46**(6): 1366-1369

[111] Huber M C, Schreiber A, von Olshausen P, *et al*. Designer amphiphilic proteins as building blocks for the intracellular formation of organelle-like compartments. Nature Materials, 2015, **14**(1): 125-132

[112] Mougin N C, van Rijn P, Park H, *et al*. Hybrid capsules *via* self-assembly of thermoresponsive and interfacially active bionanoparticle-polymer conjugates. Advanced Functional Materials, 2011, **21**(13): 2470-2476

[113] Booth R, Qiao Y, Li M, *et al*. Spatial positioning and chemical coupling in coacervate-in-proteinosome protocells. Angewandte Chemie-International Edition, 2019, **58**(27): 9120-9124

[114] Huang X, Patil A J, Li M, *et al*. Design and construction of higher-order structure and function in proteinosome-based protocells. Journal of the American Chemical Society, 2014, **136**(25): 9225-9234

[115] Huang X, Li M, Green D C, *et al*. Interfacial assembly of protein-polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells. Nature Communications, 2013, **4**: 2239

[116] Liguori L, Blesneac I, Madern D, *et al*. Single-step production of functional Oep24 proteoliposomes. Protein Expression and Purification, 2010, **69**(1): 106-111

[117] Yunker P J, Asahara H, Hung K C, *et al*. One-pot system for synthesis, assembly, and display of functional single-span membrane proteins on oil-water interfaces. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, **113**(3): 608-613

[118] Schwarz-Schilling M, Aufinger L, Muckl A, *et al*. Chemical communication between bacteria and cell-free gene expression systems within linear chains of emulsion droplets. Integrative Biology, 2016, **8**(4): 564-570

[119] Sakamoto R, Noireaux V, Maeda Y T. Anomalous scaling of gene expression in confined cell-free reactions. Scientific Reports, 2018, **8**(1): 7364

[120] Wang S, Majumder S, Emery N J, *et al*. Simultaneous monitoring of transcription and translation in mammalian cell-free expression in bulk and in cell-sized droplets. Synthetic Biology, 2018, **3**(1): ysy005

[121] Chanasakulniyom M, Martino C, Paterson D, *et al*. Expression of membrane-associated proteins within single emulsion cell facsimiles. Analyst, 2012, **137**(13): 2939-2943

[122] Aufinger L, Simmel F C. Artificial gel-based organelles for spatial organization of cell-free gene expression reactions. Angewandte Chemie-International Edition, 2018, **57**(52): 17245-17248

[123] Schwarz-Schilling M, Dupin A, Chizzolini F, *et al*. Optimized assembly of a multifunctional RNA-protein nanostructure in a cell-free gene expression system. Nano Letters, 2018, **18**(4): 2650-2657

[124] Torre P, Keating C D, Mansy S S. Multiphase water-in-oil emulsion droplets for cell-free transcription-translation. Langmuir, 2014, **30**(20): 5695-5699

[125] Gan R, Yamanaka Y, Kojima T, *et al*. Microbeads display of proteins using emulsion PCR and cell-free protein synthesis. Biotechnology Progress, 2008, **24**(5): 1107-1114

[126] Findlay H E, Harris N J, Booth P J. *In vitro* synthesis of a major facilitator transporter for specific active transport across droplet interface bilayers. Scientific Reports, 2016, **6**: 39349

[127] Matsuura T, Hosoda K, Kazuta Y, *et al*. Effects of compartment size on the kinetics of intracompartmental multimeric protein synthesis. ACS Synthetic Biology, 2012, **1**(9): 431-437

[128] Elfaramawy M A, Fujii S, Uyeda A, *et al*. Quantitative analysis of cell-free synthesized membrane proteins at the stabilized droplet interface bilayer. Chemical Communications, 2018, **54**(86): 12226-12229

[129] Friddin M S, Morgan H, de Planque M R R. Cell-free protein expression systems in microdroplets: stabilization of interdroplet bilayers. Biomicrofluidics, 2013, **7**(1): 014108

[130] Sasaki Y, Nomura Y, Sawada S, *et al*. Polysaccharide nanogel-cyclodextrin system as an artificial chaperone for *in vitro* protein synthesis of green fluorescent protein. Polymer Journal, 2010, **42**(10): 823-828

[131] Sasaki Y, Asayama W, Niwa T, *et al*. Amphiphilic polysaccharide nanogels as artificial chaperones in cell-free protein synthesis. Macromolecular Bioscience, 2011, **11**(6): 814-820

[132] Park N, Um S H, Funabashi H, *et al*. A cell-free protein-producing gel. Nature Materials, 2009, **8**(5): 432-437

[133] Kahn J S, Ruiz R C H, Sureka S, *et al*. DNA microgels as a platform for cell-free protein expression and display. Biomacromolecules, 2016, **17**(6): 2019-2026

[134] Li F, Yu W T, Zhang X, *et al*. Preparation of biomimetic gene hydrogel *via* polymerase chain reaction for cell-free protein expression. Science China-Chemistry, 2020, **63**(1): 99-106

[135] Li J, Wang H, Kwon Y C, *et al*. Establishing a high yielding streptomyces-based cell-free protein synthesis system. Biotechnology and Bioengineering, 2017, **114**(6): 1343-1353

[136] Vieregg J R, Tang T Y D. Polynucleotides in cellular mimics: coacervates and lipid vesicles. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2016, **26**: 50-57

[137] Thompson K L, Williams M, Armes S P. Colloidosomes: synthesis, properties and applications. Journal of Colloid and Interface Science, 2015, **447**: 217-228.

[138] Kojima T, Yamane T, Nakano H. In vitro selection of DNA binding sites for transcription factor, PhaR, from *Paracoccus denitrificans* using genetic library on microbeads and flow cytometry. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, **101**(5): 440-444

[139] Kojima T, Mizoguchi T, Ota E, *et al*. Immobilization of proteins onto microbeads using a DNA binding tag for enzymatic assays. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, **121**(2): 147-153

[140] Kobatake E, Ebisawa A, Asaka O, *et al*. Stabilization and translation of immobilized mRNA on latex beads for cell-free protein synthesis system. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1999, **76**(3): 217-227

[141] Ikuta K, Maruo S, Hasegawa T, *et al*. Light-drive biomedical micro tools and biochemical IC chips fabricated by 3D micro/nano stereolithography//Katagiri Y. Optomechatronic Micro/Nano Components, Devices, and Systems. Bellingham: Spie-Int Soc Optical Engineering, 2004: 52-66

[142] Tang T Y D, van Swaay D, deMello A, *et al*. *In vitro* gene expression within membrane-free coacervate protocells. Chemical Communications, 2015, **51**(57): 11429-11432

Progress on Cell-free Protein Synthesis Inside Artificial Cells*

ZHAO Jing-Jing, WANG Xue-Jing, MU Wei**, HAN Xiao-Jun**

(*Harbin Institute of Technology, Chemistry and Chemical Engineering, State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin* 150001, China)

Abstract Cell-free protein synthesis is an *in-vitro* cell-free expression method for protein synthesis. High-throughput protein expression and *in-vitro* reconstitution of membrane proteins can be realized in CFPS-containing artificial cells. This review describes various CFPS systems including *E. coli* extracts, rabbit reticulocytes extracts, wheat germ extracts, and yeast extracts, and summarizes the progress of cell free protein synthesis inside artificial cells. The challenges and the future directions of this field are also proposed at the end of this paper.

Key words cell-free protein synthesis, lipid vesicle based artificial cells, polymersome based artificial cells, proteinsome based artificial cells

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0163

---

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China（21773050，21929401）and Heilongjiang Science Funding Program for Distinguished Young Scientists（JC2018003）.

** Corresponding author.

Tel：86-451-86413708

MU Wei. E-mail：muwei@hit.edu.cn

HAN Xiao-Jun. E-mail：hanxiaojun@ hit.edu. cn

Received：May 31，2020 Accepted：July 22，2020