

DOI: 10.13376/j.cbls/2018013

文章编号: 1004-0374(2018)01-0094-06

无细胞蛋白质合成系统的研究进展及应用前景

张 米, 赵国琰, 戴美学*

(山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘 要: 无细胞蛋白质合成系统是现代迅速发展的蛋白质表达系统, 以细胞抽提物中酶和蛋白质因子等作为基本反应体系, 添加外源模板、底物以及能源物质等维持体系运作, 最终在体外合成目标蛋白质。无细胞蛋白质合成系统突破了细胞的生理限制, 能够灵活地进行蛋白质合成, 极大地提高了蛋白质的产量, 不仅可以作为研究转录和翻译的研究工具, 而且可以实现蛋白质的高通量表达, 在诸多领域带来了突破性的进展。现主要针对无细胞蛋白质合成系统的能量供给、蛋白质的稳定性和折叠修饰以及应用进行综述, 以期推动对该技术的理解和应用。

关键词: 无细胞蛋白质合成系统; 蛋白质表达系统; PURE 系统

中图分类号: Q78; Q813 **文献标志码:** A

Research progress and applications of cell-free protein synthesis system

ZHANG Mi, ZHAO Guo-Yan, DAI Mei-Xue*

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Cell-free protein synthesis system is one of modern protein expression systems based on cell extracts containing enzymes and protein factors, as well as substrates and energy substance in order to maintain the system operation. After adding an exogenous DNA template, the target protein could be ultimately synthesized *in vitro*. Cell-free protein synthesis system breaks the physiological limitations of cells, allows for flexible protein synthesis, and greatly improves the protein yield. It can be used not only as a research tool for studying transcription and translation, but also as an advanced technology for high-throughput expression of proteins. This review mainly focused on the progress and prospect of energy supplement, protein stability and folding, as well as applications of cell-free protein synthesis systems.

Key words: cell-free protein synthesis; protein expression system; PURE system

无细胞蛋白质合成系统是体外合成蛋白质的技术手段, 一般是将微生物、动物、植物细胞裂解物作为基本反应体系, 其中包含必要的反应元件, 如核糖体、氨酰合成酶、翻译起始和延伸因子、核糖体释放因子、代谢酶、分子伴侣、折叠酶等等, 添加必要的反应底物, 包括氨基酸、核苷酸、编码目标蛋白质的 DNA 或 mRNA 模板、能量底物、辅因子和盐, 完成转录、翻译、蛋白质折叠和能量代谢过程。无细胞蛋白质合成系统可以进行传统的蛋白质表达, 可以高通量表达蛋白质文库^[1]。与活细胞表达系统相比, 无细胞蛋白质合成系统简化了基因克隆步骤, 无需维持细胞的生存和生长, 反应体系

简单, 操作简便, 生产周期短, 能够提供一个开放通用的环境, 避免蛋白质表达过程中产生的细胞毒性, 可进行实时的活性监测, 可快速取样, 可直接控制蛋白质合成过程^[2]。无细胞蛋白质合成系统已经成为十分重要的蛋白质合成系统, 在大规模表达重组药物、制备蛋白质芯片、发现癌症自身抗体标志物等方面, 具有巨大的应用潜力。

收稿日期: 2017-05-08; 修回日期: 2017-08-05

基金项目: 国家自然科学基金应急管理项目(31640002); 山东省自然科学基金省属高校优秀青年人才联合基金(2015ZRB01ALJ)

*通信作者: E-mail: daimeixue@sdsu.edu.cn

无细胞蛋白质合成系统来源于天然的细胞提取物, 主要分为两种类型: 一是直接来源于细胞裂解物, 即普遍意义上的 CFPS 系统^[3-4]; 二是转录和翻译必需成分的组合, 称之为使用重组元件蛋白质合成系统 (PURE 系统)^[5]。两种类型的无细胞蛋白质合成系统本质上都是将细胞的内部反应转化为细胞外的溶液反应。PURE 系统是细胞蛋白质表达中密切相关的纯化的反应元件重组系统, 包括起始因子 (IF1、IF2、IF3)、延伸因子 (EF-Tu、EF-Ts、EF-G)、释放因子 (RF1、RF2、RF3)、核糖体循环因子、20 种氨酰 tRNA 合成酶、甲硫氨酰 tRNA 转甲酰酶和焦磷酸酶等, 所有组分均包含 6 个组氨酸标签。这些重组元件一般是从特殊大肠杆菌中分离得到的, PURE 组件结合的 6 个组氨酸亲和标签可以利用产品的“反向净化”方法获得, 即通过亲和色谱法提取标记蛋白。PURE 无细胞蛋白质合成系统已经商业化, 在生命科学实验室中被广泛研究。PURE 系统有很多的优势, 能够降低污染蛋白酶、核酸酶、磷酸酶的水平, 成分确定以便可以再现, 模块系统更加灵活, 可以避免消耗氨基酸的代谢副反应。模块化的 PURE 系统支持多种针对特殊应用的修饰, 包括核糖体显示和选择性位点整合非天然的氨基酸, 但 PURE 系统的费用限制了大规模的商业应用。目前, 以天然的细胞裂解物为基础的 CFPS 系统仍是科研工作者的主要研究对象。CFPS 系统的核糖体和 tRNA, 连同所有必要的 NTP 和氨基酸, 产 ATP 的能量供给模块和重组 T7 RNA 聚合酶, 创建了一个自给自足的反应系统, 可以使用各种 DNA 模板进行蛋白质合成^[6-9]。

本文将从无细胞蛋白质合成系统的研究进展和应用两方面来进行介绍, 旨在阐明无细胞蛋白质合成系统的关键问题和发展应用, 为该系统的深刻研究和广泛应用奠定基础。

1 无细胞蛋白质合成系统

制备 CFPS 系统基本的实验步骤包括: 细胞培养、细胞裂解、逃逸反应、透析和离心等。自 1948 年, Zamecnik 和 Frantz^[10] 通过高速离心从破碎的细胞裂解物上清液中得到反应体系, 即 S30 提取液, 相关技术在 70 年中迅速发展起来。1961 年, Nirenberg 和 Matthaei^[11] 开创性地添加氨基酸和 ATP 到大肠杆菌 S30 提取液中并进行孵育, 使得内源 mRNA 逃逸, 可以表达外源模板的蛋白质, 称之为逃逸反应。无细胞蛋白质合成系统通常持续到一种基质 (如 ATP、

半胱氨酸等) 耗尽或副产物积累 (如无机磷酸) 达到抑制浓度。改变组分比例, 可以使得蛋白质产量有很大的提高。Li 等^[12] 研究表明, 可以通过添加或调整各种影响转录和翻译的因素, 包括伸长因子 (EF-Ts、EF-Tu、EF-G 和 EF4)、核糖体循环因子 (RRF)、释放因子 (RF1、RF2、RF3)、伴侣 (GroEL/ES)、BSA 和 tRNAs, 将蛋白质产量提高 5 倍之多, 添加 IRES (内部核糖体进入位点) 的连续交换无细胞反应模式合成人类 EGFR (表皮生长因子受体) 的产量提高 100 倍之多^[13]。这些工作提供了进行体外转录和翻译的更有效的方法, 有利于解除影响整个系统效率的因素的限制。

目前, CFPS 系统大多来自大肠杆菌 (ECE)、兔网织红细胞 (RRL)、小麦胚芽 (WGE)、昆虫细胞 (ICE) 和烟草 BY-2 等裂解物^[14]。针对蛋白质来源、结构复杂与否、下游加工以及提取制备方法等条件, 研究人员正在挖掘新的材料。其中最常用的是大肠杆菌 CFPS 系统。大肠杆菌系统具有以下几个优点: 首先, 大肠杆菌容易大量发酵, 容易破碎, 提取制备方法简单; 其次, 实验蛋白质产量很高; 第三, 大肠杆菌的反应系统实验成本最低。以 RRL、WGE、ICE 为材料的真核生物 CFPS 系统应用最广泛, 可商业化, 但真核 CFPS 系统的提取制备过程复杂, 并且在批式反应中蛋白质产量较低。昆虫细胞多使用草地夜蛾细胞为材料, 昆虫细胞提取物的连续交换 CFPS 系统已被用于合成复杂的真核生物蛋白质^[15], 该系统综合了真核生物材料和连续交换的优点。烟草 BY-2 无细胞裂解物的产量很高, 而且制备时间短。除了以上种类, CFPS 系统甚至出现了古生菌、原生动物、酵母、癌症细胞和杂种细胞等提取物^[16]。如中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞 CFPS 系统, 已用于合成“难以表达”的蛋白质, 如钾离子通道、钙离子通道、G 蛋白偶联受体以及表皮生长因子受体等^[17]。与大肠杆菌系统相比, 其他表达系统具有独特优势, 可以生产复杂的蛋白质, 实现在细菌中难以实现的翻译后修饰。WGE 是有效的 CFPS 系统材料, 难以用于糖基化等翻译后加工过程。而 RRL 和 ICE 的 CFPS 系统这方面功能多样, 异戊二烯化、乙酰化、豆蔻酰化、磷酸化、泛素连接、信号肽加工和核心糖基化都已经实现^[2]。对于糖基化, ICE 比 RRL 的 CFPS 系统有优势, 核心糖基化不需要添加微粒体膜, 提供分区条件后, 在 RRL 的 CFPS 系统中添加适当的修饰酶即可, 其他系统需要将这些微粒体膜

分别纯化再添加到 CFPS 反应系统中。因此, ICE 的 CFPS 系统成为目前增长最快的 CFPS 平台。每个 CFPS 系统具有独特的优势, 使用时需要仔细考虑产量、成本和翻译修饰的需要^[18-20]。

无细胞蛋白质合成系统的反应模式与微生物发酵模式类似, 分为批式反应模式和连续反应模式(也称流加反应模式)两种。批式反应模式最为常见, 当某一反应底物耗尽即停止反应。反应时间短, 产物得率低。连续反应模式持续地提供氨基酸、ATP 等反应底物, 产物经超滤膜等滤出, 保持动态平衡, 反应持续进行, 时间延长, 产物得率高; 但是, 其运行成本高, 某些反应成分如翻译起始因子会流失, 令人困惑不解的是, 抑制产物如磷酸也会被连续去除, 而且长时间反应时, mRNA 模板的稳定性会增加, 其中机理值得探讨^[21-23]。无细胞蛋白质合成系统中使用磁珠固定 DNA 作为移动模板的方法已研发成功。微磁珠中包含化学连接的质粒, 指导无细胞蛋白质合成系统, 设计灵活, 执行简便, 可以通过添加和移除微磁珠的简单操作进行开始和结束的控制, 而且在同一体系中可以顺序表达不同的基因, 多种相关蛋白质的表达水平可以达到期望值^[24]。

无细胞蛋白质合成系统的成功应用需考虑能源供给、稳定性、蛋白质产物的折叠和修饰等方面的因素。

1.1 无细胞蛋白质合成系统发展过程中的能源供给问题

能源无疑是最重要的问题, 无细胞蛋白质合成系统脱离了细胞的限制, 但是无法获得细胞呼吸的能量, 需要在反应系统中供给可利用的能量。能量物质的高费用和副产物造成反应停滞是无细胞蛋白质合成的主要问题, 需要探索适宜的能量供给途径。在最初反应中, 能量的供给依赖第二能源物质, 通过底物水平磷酸化完成 ATP 的再生, 通过添加磷酸烯醇式丙酮酸、磷酸肌酸等物质, 使得高能磷酸键转移到 ADP 上, 生成 ATP, 但是这些物质费用高, 能量供给持续性差, 而且, 磷酸产物的过多积累抑制反应的进行。在此基础上, Kim 和 Swartz^[25] 开发出使用不含磷酸盐的能源化合物(例如葡萄糖或丙酮酸), 以丙酮酸氧化酶、过氧化氢酶和丙酮酸等代替高昂的磷酸烯醇式丙酮酸的反应模式。该反应模式中没有磷酸盐的积累, 解除了磷酸盐对反应的抑制作用。

近几年来, 麦芽糖糊精的使用^[26] 大大促进了无细胞蛋白质合成系统的发展。麦芽糖糊精通过磷

酸化作用和糖酵解途径供给无细胞蛋白质合成系统能量, 在酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) 的酯酶、绿色荧光蛋白和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的木糖还原酶的合成中被成功应用。麦芽糖糊精通过磷酸化酶的作用生成葡萄糖-1-磷酸, 然后通过糖酵解途径, 结合丙酮酸醋酸盐乳酸盐途径 PANOx 系统, 可生成乳酸盐、醋酸盐等物质。磷酸可以循环使用, 不会过多积累, 并且会使反应缓慢进行, 麦芽糖糊精的能量得到逐步释放, 提高了反应系统的连续性, 而且微小 pH 变化维持了反应系统的相对平衡。其中磷酸盐的抑制作用, 可能是因为磷酸盐会引起镁离子的沉淀, 而镁离子在核苷三磷酸的合成、蛋白质翻译特别是蛋白质翻译终止中有极其重要的作用^[27], 不可缺少。

1.2 无细胞蛋白质合成系统的稳定性

无细胞蛋白质合成系统脱离了细胞膜的保护, 细胞组分暴露于外界环境中, 容易受到干扰和破坏。常见的细胞破碎方法包括机械破碎、反复冻融、表面活性剂处理、超声波破碎和高压破碎等, 以高压破碎法最为常用。研究表明, 细胞抽提物大于 5 mL 时, 通过超声破碎和高压破碎方法所得到的产物活性, 较机械破碎方法的要高, 可能是由于能够保持破碎细胞裂解物的低温还原性环境^[28-30]。

在无细胞蛋白质合成反应体系中, 氨基酸底物的稳定性差, 如精氨酸会吸收二氧化碳、半胱氨酸易氧化、部分氨基酸易耗尽等。部分方法可以保持氨基酸底物的稳定性, 如现用现配、及时添加容易耗尽的氨基酸或者运用基因工程技术敲除降解氨基酸的酶, 可以延缓底物耗尽反应终止^[31]。

在无细胞蛋白质合成反应体系中, 模板一般是 PCR 产物或者质粒等载体, 模板稳定性差, 转录后的 mRNA 的稳定性差, 环境中的 RNA 酶给维持 mRNA 稳定性造成很大的困难。提高模板的稳定性可以从两个方面考虑, 一是模板本身的结构, 二是模板反应环境的设置。对于模板本身来说, 可以对模板进行化学修饰, 引入 5' 或 3' 次级结构来实现。可以使用 2'-O-乙酰基基团来修饰 mRNA, 可以在 3' 端引入茎环结构。真核细胞的 mRNA 有 5' 帽子结构和 3'-poly(A) 尾巴, 可以利用 3'-poly(A) 尾巴将其固定在固相介质上, 以提高 mRNA 的稳定性, 增加模板的稳定性^[32]。无细胞蛋白质合成系统需要 Mg^{2+} , 以防止核糖体 RNA 在特定位点被切割, 从而维持模板的稳定性^[33]。

1.3 蛋白质产物的折叠和修饰

在无细胞蛋白质合成系统中, 蛋白质产物的折叠依然是关键的问题, 实现复杂蛋白质的自然折叠是十分困难的。在传统蛋白质表达系统中, 一般通过变性复性、融合蛋白表达等方法促进异源蛋白质正确折叠。在无细胞蛋白质合成系统中, 情况较为复杂。细胞破碎得到的细胞抽提物处于还原性的环境, 以保持酶等蛋白质因子活性部位的活性和蛋白质构象的稳定, 但还原性的环境不利于蛋白质的折叠。因此, 在获得蛋白质产物后, 需要将产物蛋白质置于氧化性环境中, 进行蛋白质折叠。Kim 和 Swartz^[34] 利用碘乙酰胺处理细胞提取物, 使细胞酶的游离巯基对形成共价对, 使用谷胱甘肽缓冲体系提供氧化环境, 并提供二硫键形成酶 DsbC 等, 通过这些方法基本解决了蛋白质产物的折叠问题。

此外, 也可利用二硫键异构酶和分子伴侣等促进蛋白质正确折叠。Welsh 等^[35] 将真核 Hsp70 分子伴侣 BiP 结合到触发因子上, 而触发因子是大肠杆菌核糖体中协助折叠的分子伴侣, 从而模仿了分子伴侣在内质网中协助折叠的过程。还可以在反应中添加两性多糖纳米凝胶颗粒, 控制释放肽链, 减少聚合和错误折叠蛋白质^[36], 促进蛋白质产物的正确折叠。在反应体系中加入相应的底物和酶还可以实现蛋白质的修饰。

2 无细胞蛋白质合成系统的应用

随着无细胞蛋白质合成系统的飞速发展, 实验成本降低, 反应规模扩大, 可以合成更加复杂的蛋白质, 无细胞蛋白质合成系统的应用随之日益广泛。

在后基因组时代中, 高通量蛋白质表达越来越重要, 无细胞蛋白质合成系统可以发挥至关重要的作用。首先, 直接使用 PCR 模板, 省去了分子克隆的复杂步骤, 减少持续实验时间, 短时间内可以合成蛋白质药物^[37-38], 从而实现个性化医疗, 在肿瘤等重大疾病的治疗中发挥重要作用; 其次, 批式反应产量越来越大, 而且, 反应体系可以微型化和芯片化; 最后, 缺乏细胞膜和细胞壁的限制, 可以调控反应条件。Hong 等^[39] 实现了多肽链中非天然氨基酸 (NSAAs) 的插入。释放因子 1 缺失的大肠杆菌无细胞蛋白质合成系统高效地激活了多特异位点非天然氨基酸的插入, 而未修饰的 tRNA 在识别密码子时具有特异性^[40], 从而导致非标准氨基酸在蛋白质特异位点掺入, 产生了新结构和功能的酶, 赋予蛋白独特的药理特性, 提高了药物蛋白的稳定性,

取得了突破性的进展。在没有补充缓冲液和加入保护性试剂如还原剂 DTT 的情况下, 制备细胞提取物具有挑战性。反应系统需要使用高度浓缩的细胞提取物, 以保持细胞内容物的天然状态。可以通过加入惰性高分子如聚乙二醇和聚蔗糖, 形成大分子拥挤的环境, 而且聚乙二醇和聚蔗糖显示良好的生物相容性, 可模仿存在于活细胞的大分子, 大幅度提高了蛋白质的产量^[41]。*Serratia* sp. 无细胞蛋白质合成系统成功合成了有功能的磷脂酶 A1, 可以用于植物油生产, 表明无细胞蛋白质合成系统将会成为快速合成工业生物催化剂的可行性选择^[42]。张绪^[43] 以及 Wu 和 Swartz^[44] 通过提供内膜囊泡、膜结合组分以及脂质环境, 成功合成四环素泵和甘露醇通透酶, 有望实现膜蛋白的高效表达, 为重要膜蛋白结构的解析或者蛋白质相互作用以及功能机理研究提供强有力的支持。Bundy 等^[45] 利用 CFPS 系统成功地在外合成了 MS2 衣壳蛋白, Yang 等^[46] 在 CFPS 系统中成功地实现了 B 细胞淋巴瘤疫苗的可溶性表达。大量事实表明, 无细胞蛋白质合成系统在膜蛋白、病毒样颗粒、肿瘤疫苗等领域应用日益广泛, 尤其是在生物制药领域, 具有十分重要的意义。

在基础研究领域, 利用无细胞蛋白质合成系统可以直接对表达产物进行核磁共振分析, 目前已确定了数千个蛋白质的结构^[47-49]。可以通过合成蛋白质建立蛋白质阵列, 解开基因产物的功能^[50-52]; 应用核糖体展示和 mRNA 展示技术^[53-54], 更有利于实现高通量筛选^[55-56], 全面深入研究基因特征和功能。无细胞蛋白质合成系统的广泛应用极大地促进了蛋白质组学的发展。

3 小结

无细胞蛋白质合成系统, 尤其是 CFPS 系统, 是潜力巨大的技术平台, 不再局限于小规模的研究水平, 可以进行蛋白质高通量表达, 可以插入非天然的氨基酸, 可以进行蛋白质芯片的改进, 可以合成膜蛋白和病毒样颗粒等。全面探索无细胞蛋白质合成系统的部分工作已经展开, 如评估核糖体水平的方法研究^[57], 但是无细胞蛋白质合成系统的若干关键问题还需要不断探索, 才可以推进无细胞蛋白质合成系统的持续发展。首先, 无细胞蛋白质合成系统需要解决活性蛋白合成反应持续时间较短, 导致低蛋白质产率的问题。虽然使用麦芽糖糊精可以大大提高无细胞蛋白质表达系统的效率, 但是能

量供给问题需要不断进行探索。其次,无细胞蛋白质合成系统虽然可以进行简单地修饰,但如何实现一些成熟蛋白质包括药物蛋白质所需的极其复杂的修饰,还需要不断探索;而模仿细胞内环境可以促进蛋白质正确定位和折叠,是重要的研究思路。最重要的是,目前无细胞蛋白质合成系统还基本属于“黑箱”技术,这是阻碍无细胞蛋白质合成系统大规模实际应用的至关重要的原因。可喜的是,大量研究成果已解除了无细胞蛋白质合成系统的诸多限制,使得无细胞蛋白质合成系统得到了极大发展。尤其是,近来100 L规模的无细胞蛋白质合成系统的实现,开启了无细胞蛋白质合成系统表达工业规模级别蛋白质的未来。

总而言之,无细胞蛋白质合成系统突破了细胞的限制,反应体系更加灵活,无论是高通量表达,还是个性化表达,无细胞蛋白质合成系统都有自身独特的优势。尽管无细胞蛋白质合成系统还面临很多挑战,相信不久的将来,无细胞蛋白质合成系统将会成为蛋白质合成的通用平台,无细胞蛋白质合成系统的应用时代即将来临。

[参 考 文 献]

- [1] 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: 559-64
- [2] Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv*, 2012, 30: 1185-94
- [3] Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 150-6
- [4] Woodrow KA, Airen IO, Swartz JR. Rapid expression of functional genomic libraries. *J Proteome Res*, 2006, 5: 3288-300
- [5] Ohashi H, Kanamori T, Shimizu Y, et al. A highly controllable reconstituted cell-free system--a breakthrough in protein synthesis research. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11: 267-71
- [6] Shimizu Y, Kanamori T, Ueda T. Protein synthesis by pure translation systems. *Methods*, 2005, 36: 299-304
- [7] Wang HH, Huang PY, Xu G, et al. Multiplexed *in vivo* His-tagging of enzyme pathways for *in vitro* single-pot multienzyme catalysis. *ACS Synth Biol*, 2012, 1: 43-52
- [8] Whittaker JW. Cell-free protein synthesis: the state of the art. *Biotechnol Lett*, 2013, 35: 143-52
- [9] Shimizu Y, Ueda T. PURE technology. *Methods Mol Biol*, 2010, 607: 11-21
- [10] Zamecnik PC, Frantz ID Jr. Incorporation *in vitro* of radioactive carbon from carboxyl-labeled DL-alanine and glycine into proteins of normal and malignant rat livers. *J Biol Chem*, 1948, 175: 299-314
- [11] Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1961, 47: 1588-602
- [12] Li J, Gu L, Aach J, et al. Improved cell-free RNA and protein synthesis system. *PLoS One*, 2014, 9: e106232
- [13] Buntru M, Vogel S, Spiegel H, et al. Tobacco BY-2 cell-free lysate: an alternative and highly-productive plant-based *in vitro* translation system. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 37
- [14] Quast RB, Sonnabend A, Stech M, et al. High-yield cell-free synthesis of human EGFR by IRES-mediated protein translation in a continuous exchange cell-free reaction format. *Sci Rep*, 2016, 6: 30399
- [15] 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: e96635
- [16] Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, et al. Cell-free protein synthesis: Pros and Cons of prokaryotic and eukaryotic systems. *Chembiochem*, 2015, 16: 2420-31
- [17] Thoring L, Wustenhagen DA, Borowiak M, et al. Cell-free systems based on CHO cell lysates: optimization strategies, synthesis of "Difficult-to-Express" proteins and future perspectives. *PLoS One*, 2016, 11: e0163670
- [18] 洪励上, 苏志宁. 无细胞蛋白表达系统研究进展. *科技经济市场*, 2009, 6: 14-5
- [19] 马英伟, 温红玲, 王志玉, 等. 无细胞蛋白合成系统的发展及应用. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26: 150-2
- [20] 杨英超, 辛晓芳. 无细胞蛋白合成系统的研究进展. *中国药事*, 2011, 25: 832-5
- [21] Rosenblum G, Cooperman BS. Engine out of the chassis: cell-free protein synthesis and its uses. *FEBS Lett*, 2014, 588: 261-8
- [22] 王景林, 高培基. 无细胞系统的基因表达与蛋白质合成. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25: 37-40
- [23] 徐志南, 陈海琴, 汪家权, 等. 无细胞蛋白质合成系统的研究进展. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20: 289-93
- [24] Lee KY, Lee KH, Park JW, et al. Flexible programming of cell-free protein synthesis using magnetic bead-immobilized plasmids. *PLoS One*, 2012, 7: e34429
- [25] Kim DM, Swartz JR. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 66: 180-8
- [26] Wang Y, Zhang YH. Cell-free protein synthesis energized by slowly-metabolized maltodextrin. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 58
- [27] 贾晓歌, 邓子新, 刘天罡. 无细胞蛋白表达体系研究进展及在生物制药领域中的应用. *微生物学报*, 2016, 56: 530-42
- [28] Kwon YC, Jewett MC. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. *Sci Rep*, 2015, 5: 8663

- [29] 胡连平, 吴德昌, 龚诒芬. 三种破碎细胞方法的比较研究. 军事医学科学院院刊, 1988, 12: 154-7
- [30] 王雪, 权春善, 王建华, 等. 不同细胞破碎方法对无细胞蛋白表达系统细胞抽提物活性的影响. 中国生物工程杂志, 2011, 31: 46-50
- [31] Michel-Reydellet N, Calhoun K, Swartz J. Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome. *Metab Eng*, 2004, 6: 197-203
- [32] 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: 217-27
- [33] Failmezger J, Nitschel R, Sanchez-Kopper A, et al. Site-specific cleavage of ribosomal RNA in *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis systems. *PLoS One*, 2016, 11: e0168764
- [34] Kim DM, Swartz JR. Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 85: 122-9
- [35] Welsh JP, Bonomo J, Swartz JR. Localization of BiP to translating ribosomes increases soluble accumulation of secreted eukaryotic proteins in an *Escherichia coli* cell-free system. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 1739-48
- [36] Sasaki Y, Asayama W, Niwa T, et al. Amphiphilic polysaccharide nanogels as artificial chaperones in cell-free protein synthesis. *Macromol Biosci*, 2011, 11: 814-20
- [37] 胡元, 张宇琛, 徐焱成, 等. 无细胞蛋白合成体系实现胰岛素原可溶性表达. *生物工程学报*, 2017, 33: 467-77
- [38] 卢元. 无细胞合成技术及其生物医药大分子工程[C]//中国生物工程学会青年工作委员会. 中国生物工程学会第二届青年科技论坛暨首届青年工作委员会学术年会论文集. 中国生物工程学会青年工作委员会, 2017: 1
- [39] Hong SH, Ntai I, Haimovich AD, et al. Cell-free protein synthesis from a release factor 1 deficient *Escherichia coli* activates efficient and multiple site-specific nonstandard amino acid incorporation. *ACS Synth Biol*, 2014, 3: 398-409
- [40] Ge X, Luo D, Xu J. Cell-free protein expression under macromolecular crowding conditions. *PLoS One*, 2011, 6: e28707
- [41] Takai K, Takaku H, Yokoyama S. Codon-reading specificity of an unmodified form of *Escherichia coli* tRNA^{1Ser} in cell-free protein synthesis. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 2894-9
- [42] Lim HJ, Park YJ, Jang YJ, et al. Cell-free synthesis of functional phospholipase A1 from *Serratia* sp. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 159
- [43] 张绪. 无细胞体系高效合成复杂膜蛋白的关键技术及工业应用探索[D]. 杭州: 浙江大学, 2014
- [44] Wu JJ, Swartz JR. High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778: 1237-50
- [45] Bundy BC, Franciszkowicz MJ, Swartz JR. *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100: 28-37
- [46] Yang J, Kanter G, Voloshin A, et al. Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89: 503-11
- [47] Morita EH, Sawasaki T, Tanaka R, et al. A wheat germ cell-free system is a novel way to screen protein folding and function. *Protein Sci*, 2003, 12: 1216-21
- [48] Ozawa K, Dixon NE, Otting G. Cell-free synthesis of 15N-labeled proteins for NMR studies. *IUBMB Life*, 2005, 57: 615-22
- [49] Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Chapter 2. Development of key technologies for high-throughput cell-free protein production with the extract from wheat embryos. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2008, 75: 53-84
- [50] Chong S. Overview of cell-free protein synthesis: historic landmarks, commercial systems, and expanding applications. *Curr Protoc Mol Biol*, 2014, 108: 16. 30. 1-11
- [51] 刘磊, 代佳宇, 王红叶, 等. 无细胞表达蛋白芯片研究进展. *生命的化学*, 2017, 37: 9-15
- [52] 吕林莉, 刘必成. 基于无细胞蛋白表达的蛋白质微阵列技术. *生物医学工程学杂志*, 2010, 27: 1397-400,409
- [53] Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ. An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 9022-6
- [54] Zahnd C, Amstutz P, Pluckthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins *in vitro* that specifically bind to a target. *Nat Methods*, 2007, 4: 269-79
- [55] 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. *Acta Trop*, 2010, 114: 171-6
- [56] Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, et al. Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun*, 2008, 76: 1702-8
- [57] Kempf N, Remes C, Ledesch R, et al. A novel method to evaluate ribosomal performance in cell-free protein synthesis systems. *Sci Rep*, 2017, 7: 46753