

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-069

## 无细胞合成策略在生物材料研究中的应用

吉博涛, 钱志刚, 夏小霞

(上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 教育部代谢与发育科学国际合作联合实验室, 上海 200240)

**摘要:** 生物材料凭借其可再生、可降解及生物相容性好等诸多优点, 在生物技术及生物医学应用领域备受关注。基于“自下而上”设计理念的无细胞表达系统, 作为细胞合成体系的有益补充, 大力加速了生物材料的开发生产及其应用范围, 并成为了材料合成生物学发展的前沿。本文介绍了无细胞表达系统的独特优势, 并列举了其用于生物材料可持续生产的策略、与材料结合后的创新设计、赋予材料功能化和智能化方法, 以及通过加速设计-构建-测试 (DBT) 循环来促进新型生物材料开发的各项应用, 而这些例证都充分表明无细胞策略在生物材料设计与合成中的创新优势。尽管无细胞表达系统用于生物材料合成仍然存在诸如成本、翻译后修饰较弱、亟需交叉领域合作等方面的挑战, 但相信随着合成生物学的发展及多学科交叉研究的深入, 无细胞表达系统将为新型生物材料研发及产业化提供强大的助力, 并为共同解决全球环境问题、保护人类生命健康等方面作出不可忽视的贡献。

**关键词:** 生物材料; 无细胞表达系统; 材料智能化和功能化; DBT 循环; 合成生物学

**中图分类号:** Q81 **文献标志码:** A

## Application of cell-free synthesis strategy in biomaterial research

JI Botao, QIAN Zhigang, XIA Xiaoxia

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic and Developmental Sciences, School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** As various issues such as global warming, environmental pollution and the exhaustion of fossil resources become increasingly severe, biomaterials have attracted increasing attention in the fields of biotechnology and biomedical engineering due to their many advantages such as renewable, degradable nature, and good biocompatibility. Based on the “bottom-up” design concept, cell-free expression system as a useful supplement to the cell synthesis system, greatly accelerates the development of biomaterials and expands their application range, becoming a frontier of the materials synthetic biology. This review first introduces the difference between cell-free expression system and conventional cell expression system, and emphasizes the unique advantages of cell-free expression system. Next, this review overviews the application of cell-free strategies in sustainable production, functionalization and innovative design of biomaterials, as well as promotion of new types by accelerating the Design-Build-Test (DBT) cycle. All of

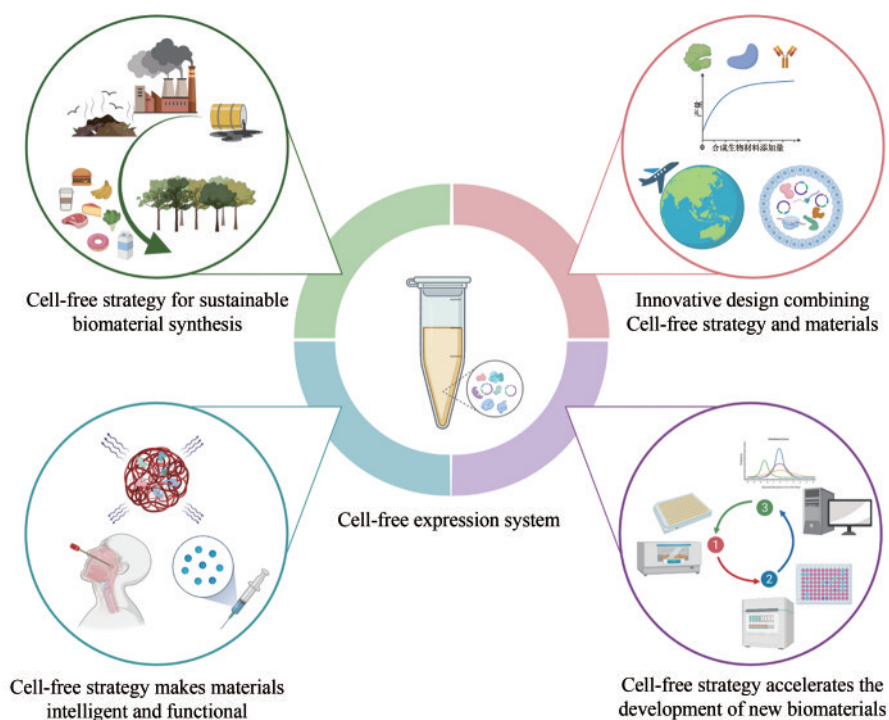
收稿日期: 2021-06-30 修回日期: 2021-07-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2020YFA0907702); 国家自然科学基金 (32071414, 22075179); 上海市自然科学基金 (21ZR1432100)

引用本文: 吉博涛, 钱志刚, 夏小霞. 无细胞合成策略在生物材料研究中的应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 658-675

Citation: JI Botao, QIAN Zhigang, XIA Xiaoxia. Application of cell-free synthesis strategy in biomaterial research[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 658-675

these examples fully demonstrate the advantages of cell-free systems in the design and synthesis of novel biomaterials. Although the use of cell-free expression systems for biomaterial synthesis encounters challenges such as cost, weak post-translational modification, and urgent need for cross-field cooperation, we still believe that in the near future, with the development of synthetic biology and the deepening of interdisciplinary research, cell free strategy will provide a faster, cheaper and more friendly way to produce new biomaterials, thereby protecting the earth environment on which we depend. In addition, the continuous development of smart materials that are combined with cell-free strategies, such as virus detection biosensors, will protect the health of human beings around the world to a great extent, and even save thousands of lives. All in all, the cell-free expression system will definitely provide a powerful boost to the research and industrialization of new biomaterials, and make a non-negligible contribution to the joint solution of global environmental problems and the protection of human health.



**Keywords:** biomaterials; cell-free expression system; material intelligence and functionalization; DBT cycle; synthetic biology

材料科学自20世纪60年代成为一门独立的学科以来，就一直作为热门的研究领域而受到大批研究者的青睐<sup>[1]</sup>。经过几十年的发展，该学科的研究已经从相对简单的陶瓷材料覆盖到复杂的聚合物材料、半导体材料等。特别是近些年来，材料科学与其他学科的结合日益紧密，研究成果层出不穷。如何开发新材料并改造它们的性能以造福人类，已经成为全世界多个机构所倡议的目标<sup>[2]</sup>。然而，随着人类对物质需求的不断增长，

全球环境问题也日渐严峻：人类每年砍伐约150亿棵树<sup>[3]</sup>；对化石燃料的依赖度高达总能源的84%；二氧化碳的排放量连续4年创下历史新高<sup>[4]</sup>；而全球海洋中仍有超过5万亿个难以降解的塑料碎片在漂泊<sup>[5]</sup>。显然，人类必须面对生产大量材料却难以降解它们而带来的不可逆转的全球环境问题<sup>[6]</sup>。

研究人员一直在为解决以上问题而努力着。随着基因工程的发展，低成本的基因合成及测序方法逐渐被开发出来<sup>[7]</sup>，只有20多年历史的合成

生物学（也称工程生物学）发展愈加迅猛。其中，合成生物学与材料科学相结合的材料合成生物学，作为一个可以缓解全球环境问题的潜在解决方案，而备受人们的关注。材料合成生物学所研究的生物材料可以是可持续、可再生且可降解的<sup>[8]</sup>，例如PLA（polylactic acid，聚乳酸）可用作生物塑料，以减轻全球对聚苯乙烯或聚乙烯等基于化石燃料的聚合物材料的过分依赖，使用后还可以作为家养植物的肥料，从而适当缓解全球垃圾处理和化肥生产的压力<sup>[9]</sup>；除此之外，生物材料凭借其优异的生物相容性，被广泛用于组织工程、医疗设备和制药行业<sup>[10]</sup>，例如丝素与胶原等蛋白材料可以规避使用合成聚合物而造成的潜在免疫原性和毒性等缺点<sup>[11]</sup>。在未来，如何通过更创新的理念来设计细菌、真菌和无细胞策略以合成难以想象的新型材料，大家都在翘首以盼<sup>[12]</sup>。注意：严格意义上来说，生物材料并不完全等同于由生物系统合成的材料<sup>[13]</sup>，例如具有生物相容性的环烯烃共聚物（COC）、聚碳酸酯（PC）、聚醚酰亚胺（PEI）和医用级聚氯乙烯（PVC）等医用材料也称为生物材料<sup>[14]</sup>。在本文中，生物材料特指由生物系统合成或与生物系统结合的材料。

生物系统的复杂性使其必须采用工程上设计周期的概念，即迭代地设计、构建和测试生物系统<sup>[15-17]</sup>。但是，当前的单元设计方法通常昂贵且费时费力<sup>[18]</sup>，相比之下，无细胞表达系统则非常适合实现快速的设计-构建-测试（DBT）循环<sup>[19]</sup>。此外，无细胞表达系统还为生物材料的合成提供了多项优势：①通过引入带有新型侧链基团的非天然氨基酸（unnatural amino acids, UNAAs）来扩展生物材料的功能<sup>[20]</sup>；②将输入的资源集中于目标产品的合成而无需维持活细胞的内部代谢活动，从而带来更高的资源利用率<sup>[21]</sup>，且无需考虑产品和中间体可能带来的细胞毒性<sup>[22]</sup>；③可以更精确地设计和控制系统组件，实现通路设计更大的系统性及灵活性；④无需破碎细胞膜，使产品纯化更为简单；⑤选择使用多种环境条件甚至是非生理环境进行反应，从而具有环境条件的高包容性。这些优点使无细胞表达系统在生物材料的设计合成方面展现出引人注目的潜力<sup>[21]</sup>。

如今，无细胞表达系统越来越多地被应用于

生物材料的开发设计和生产。随着文献中示例的不断增加，有理由相信生物材料将成为无细胞表达系统的下一个应用前沿。基于此，本文围绕无细胞策略与材料结合这一主题，首先介绍无细胞表达系统的特点及其与传统体系相比的优劣势；随后展示无细胞表达系统与材料结合的多种创新型设计以及无细胞表达系统赋予材料智能化及功能化的能力；其次列举无细胞表达系统用于加速新型生物材料开发的优点；最后本文还将探讨无细胞材料合成生物学的现有机遇及挑战，并推测它们未来为材料合成生物学这一新兴研究领域带来的深远影响。

## 1 无细胞表达系统

作为一个新兴的科学领域，合成生物学将来自生命世界的各种灵感与工程原理相结合，在医学、生物制造和绿色化学等领域取得了许多值得肯定的成就<sup>[18, 23]</sup>。然而细胞膜本身及其复杂的内源代谢网络带来的壁垒性，也阻碍着合成生物学的进一步发展<sup>[18]</sup>。基于此，研究人员开发了无细胞表达（CFE）系统，并希望其可以成为解决这些问题的重要工具<sup>[24]</sup>。例如，Eduard Buchner<sup>[25]</sup>开创性地使用酵母细胞提取物将糖转化为乙醇和二氧化碳方面的成果已经获得诺贝尔奖（1907年诺贝尔化学奖）的肯定。之后，Nirenberg及其同事<sup>[26]</sup>通过使用大肠杆菌提取物发现了遗传密码子，也获得了1968年的诺贝尔生理学或医学奖。

CFE系统是一种使用细胞粗提物，而非完整活细胞进行DNA转录和翻译的生物系统。因为细胞粗提物在一定程度上保留了细胞原有的天然转录和翻译机制，所以只需外源补充相应的物质就可以启动蛋白质的合成。CFE系统和细胞表达系统在蛋白质合成步骤上存在较大差异（图1）。具体而言，CFE系统首先将宿主接种于富含营养的培养基中生长，接着通过高压匀浆、超声或冻融等方式进行细胞裂解，随后通过离心去除细胞碎片和原细胞基因来获得粗提物——该细胞粗提物中含有后期蛋白质合成所必需的物质，如核糖体、RNA聚合酶、用于能量和ATP再生的代谢酶以及其他用于转录和翻译辅助蛋白（如Sigma因子、起始因子和延伸因子）等。最后，将表达目标蛋白

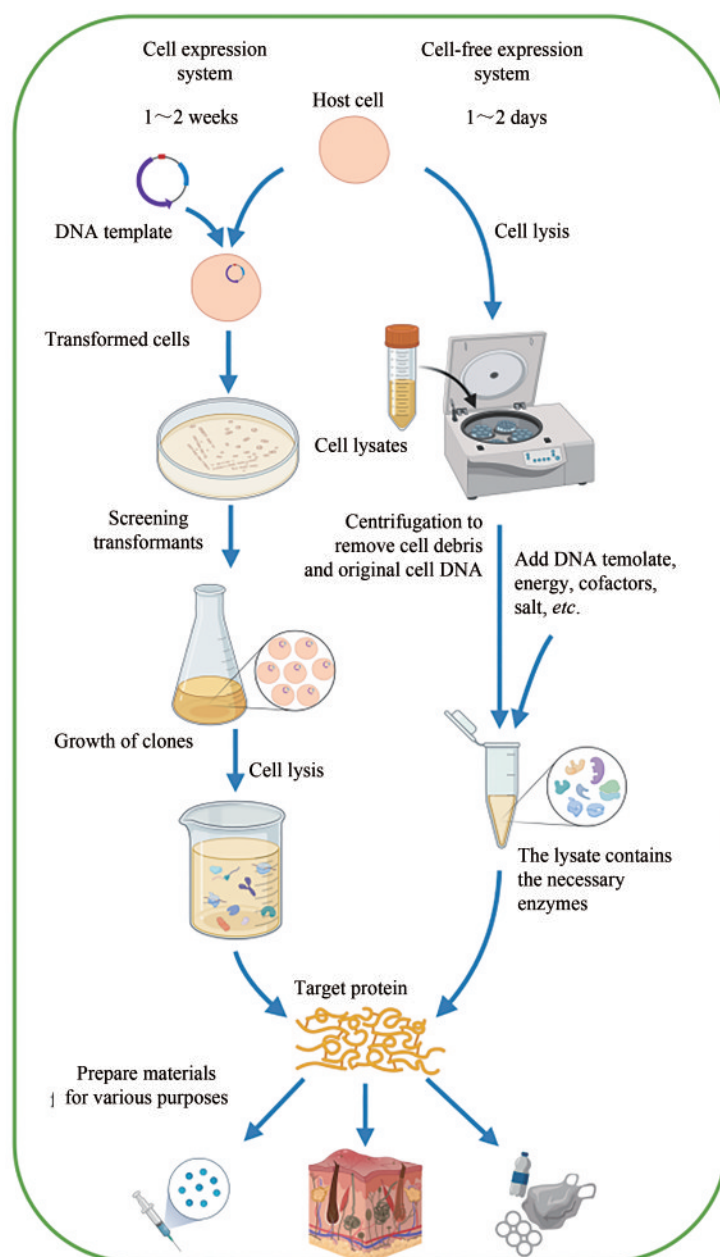


图1 细胞表达系统与无细胞表达系统的差别

Fig. 1 The difference between cell expression system and cell-free expression system

的DNA模板（质粒DNA或线性DNA，通常浓度为 $1\sim 20\text{ nmol/L}$ ）、能源物质（如葡萄糖、磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸、糖酵解中间体、磷酸肌酸等）、辅因子（如 $\text{NAD}^+$ 、辅酶A）和盐（如谷氨酸盐、乙酸盐）等加入细胞提取物中，并在合适的条件下反应（一般为 $16\sim 37\text{ }^\circ\text{C}$ ， $1\sim 24\text{ h}$ ）。一般标准的反应体积为 $10\text{ }\mu\text{L}$ ，但可以根据应用将反应体积在 $10^{-15}\sim 10^3\text{ L}$ 之间切换。以上反应通常在批次反应中完成，模式蛋白质的产量可高达 $2\text{ mg/mL}$  [18, 20, 27]。

需要注意的是，在本篇文章中，我们认为“无细胞表达（CFE）系统”是较为恰当的名称——并用它来指代体外将DNA转录为RNA并翻译为功能性蛋白质的方法，在其他发表的文献中该方法还经常被命名为：无细胞蛋白质合成（CFPS）[28]、无细胞转录-翻译（TX-TL）[29]、无细胞代谢工程（CFME）[30]、无细胞化学生物合成（CFCB）[31]等。

反映在具体的特征上，CFE系统和细胞表达系统各有优缺点，见表1。

表1 无细胞表达系统的优缺点<sup>[32-34]</sup>

Tab. 1 The advantages and disadvantages of cell-free expression systems

特征	细胞表达系统	无细胞表达系统
转录和翻译	-具有细胞膜,细胞内表征和产物释放可能具有挑战性 -内源性调控难以预测和修改 +能够使用定向进化技术	+开放的环境易于实时操作和控制 +直接添加底物或收获产物 +易于使用来自多种生物体的酶途径
翻译后修饰	+简单	-困难
自我复制	+简单	-困难
DNA 模板	-质粒(或者整合到基因组的 DNA)	+质粒或 PCR 产物
引入非天然氨基酸	-困难	+简单
膜蛋白和复合蛋白的合成	-由于细胞内环境有限而难以合成	+通过添加表面活性剂或调整系统环境易于合成
对毒性的耐受力	-低,难以合成毒性蛋白 -若中间产物有毒性,则可行性受到限制	+高,可以合成毒性蛋白 +无限制(如某些途径酶使用体积分数为12%异丁醇)
设计-构建-测试(DBT)循环	-慢,1~2周	+快,1~2天
资源利用率	-较低,由于复杂的细胞代谢而将资源转向细胞维护和副产品	+较高,所有资源都可以直接用于生产产品
与材料整合的能力	-困难	+简单
生物制造	-适中的产率和产量 -纯化前需再次裂解细胞 -不易放大生产,工业规模发酵条件是不同的 -菌种污染可能是灾难性的 +多年实践经验;完善的方法	+较高的产率和产量 +无须细胞裂解的简单的纯化过程 +易于放大生产,具有线性放大的可能 -较为年轻,最近成立
成本	+低到适中	-中高,主要为酶和辅因子成本
稳定性	-通过发酵条件影响细胞环境	+由工程师直接控制反应条件

注:表中“+”代表具有优势,“-”代表具有劣势。

Note: "+" in the table represents advantages, and "-" represents disadvantages(This table shows the advantages and disadvantages of the cell-free expression system compared to the cell expression system. The main advantages of the cell expression system are: strong post-translational modification, capable of using directed evolution technology, self-replication, rich bio-manufacturing experience and low cost; while the main advantages of the cell-free expression system are: the open system easy to operate, PCR products possibly used as expression templates, easy to introduce UNAAs, suitable for the synthesis of membrane proteins and toxic proteins, saving time, high resource utilization, and easy to combine with materials.)

其中,CFE系统最显著的优点是节省时间,可以将1~2周的表达时间缩短为1~2天。其次,相较于细胞表达系统,CFE系统是一种开放的系统。相比之下,在细胞表达系统中,一旦将DNA模板插入细胞中,就必须等到整个蛋白质表达流程完成并裂解细胞后,才能分析目标蛋白质的表达效果。但是对于CFE系统,细胞膜的缺失使得研究人员可以直接控制整个反应环境,并且可以随时对样品进行采集和监测。除此之外,CFE系统还可以合成对细胞有毒害的蛋白质——而这些蛋白质一般是细胞表达系统难以合成的<sup>[27]</sup>。但是,必须肯定的是细胞表达系统仍然承担了目前合成生物学相关领域主要的研究和生产任务,并且其所积累的成果和优势并非CFE系统可取代的。作为细胞表达系统的有益补充,CFE系统逐渐在很多细胞表达系统无法胜任的

领域开始发挥重要作用。基于此,本文接下来将展示CFE系统在材料合成生物学中令人印象深刻的应用,并且这些都强烈地暗示出生物材料的无细胞策略在未来大有可为。

## 2 无细胞表达系统在生物材料研究中的应用

虽然CFE系统的基础研究已经向人们展示出了它的独特优势,但是在初始创立的几十年中,它的工程应用一直受到一些关键因素的限制,如:低且不稳定的蛋白质产量、反应持续时间短、试剂成本高(如额外添加的能量物质和酶)、反应规模较小、弱的翻译后修饰以及昂贵的非标准化的

裂解物制备等<sup>[22, 30, 35]</sup>。

但是, 随着技术问题的不断突破, 上述限制正在逐渐被解决。今天, CFE系统每升反应体积的蛋白质产量已达到克级, 间歇反应的持续已超过10 h, 反应规模也已达到里程碑式的100 L——而这些结果在10年前都被认为是不可能完成的<sup>[36-38]</sup>; 通过更好地了解 and 调控反应及代谢过程, 无细胞反应的成本也已降低几个数量级<sup>[39]</sup>; 同时随着越来越多新方法的开发, 毒性蛋白、膜蛋白以及翻译后修饰等问题也得到了较好的解决<sup>[40]</sup>; 另外, 研究人员也开发出了更简单、更低成本且更容易的方案, 来获得大批量的细胞提取物<sup>[41-42]</sup>。经过研究人员近些年来的努力, CFE系统的应用范围得到了爆炸式的增长, 其不再仅适合于生物过程中小规模的机理研究及原型设计, 也可以用于更大规模的生物产品的合成与生产<sup>[43]</sup>。在上述背景下, 本文将在这一章列举CFE系统与材料合成开发相结合的应用实例, 以彰显CFE系统在生物材料设计与合成方面的巨大应用潜力: 首先反映在合成方面, CFE系统可以实现生物材料的绿色可持续生产, 同时借助材料也可以提升CFE系统的合成性能及应用范围(2.1&2.2); 接着在生物材料的创新设计方面, 借助CFE系统可以赋予现有材料更为丰富的功能和应用, 并且加速未来新型生物材料的设计与筛选(2.3&2.4)。

## 2.1 可持续生物材料合成的无细胞策略

如今, 化学品和材料的原料几乎全部来自化石燃料及其产品<sup>[44]</sup>。例如, 石化行业历来专注的7种低成本、大规模的商业化学品(甲醇、乙烯、丙烯、丁二烯、苯、甲苯、二甲苯)几乎合成了所有的常用材料<sup>[45]</sup>。然而大规模使用化石燃料, 也带来了愈加严峻的环境问题。相较基于化石燃料的生产模式, 生物合成方式有着众多优势<sup>[46]</sup>, 例如: 可再生、不增加温室气体的排放、产品通常是可生物降解的等<sup>[47]</sup>。但是, 生物产品在成本上往往处于劣势<sup>[48]</sup>, 而近些年无细胞策略在降低材料合成成本方面做出较大贡献, 将在一定程度上推动生物材料可持续合成的商业化。

降低生物材料合成成本的重点研究方向之一

是如何利用廉价、本地化的原料来生产所需的生物材料<sup>[49]</sup>。以聚羟基脂肪酸酯(PHA)为例, 作为一种生物聚合物, 其具有与石化衍生塑料类似的理想的材料性质<sup>[50]</sup>。然而, 大规模工业生产PHA最主要的瓶颈之一是其微生物碳底物的成本过高(据估计占整个生产过程成本的28%~50%)<sup>[51]</sup>。目前解决此问题的潜在方案是使用食物垃圾等低成本、本地化的资源替代原有昂贵的原料<sup>[50]</sup>, 例如, 研究人员已经开发出以食物垃圾为原料来合成生物材料的无细胞策略: Kelwick等使用奶酪制作过程的副产品乳清为原料, 去除其中部分的盐, 并将得到的乳清渗透物加入CFE系统中, 从而开发出了PHA的无细胞生产平台<sup>[52]</sup>, 该研究成果值得关注的是, 一些微生物的PHA生产策略可以与CFE系统兼容, 特别是使用本地采购得到的低成本原料(例如乳清渗透物)时, 可能有助于使PHA生产更具经济可行性<sup>[52-53]</sup>。类似的, 因为CFE系统有克服体内代谢工程所遇到的内部调节机制、细胞生长代谢负担和活细胞化学敏感度等方面挑战的潜力<sup>[33, 54]</sup>, Kopp等<sup>[55]</sup>通过构建以废咖啡渣(SCG)为原料的无细胞平台, 生产出了乳酸(LA)<sup>[56]</sup>(可生物降解的聚合物聚乳酸的原料), 并取得了良好的成果。除此之外, 无细胞系统还有利于快速评估代谢通路性能和识别潜在瓶颈, 并对微生物的代谢研究给予启发<sup>[55]</sup>。

将输入的资源尽可能地用于生物材料本身的合成, 也是节约成本的重要策略。而CFE系统作为一个专注于目标蛋白质合成本身的系统, 可以消除活细胞中不需要的副反应, 从而使输入糖的理论产量接近100%<sup>[31]</sup>。Opgenorth等<sup>[57]</sup>认为, 为了控制成本, 在CFE系统连续运行时, 必须尽可能少地消耗原料化学品。因此他们构建了一种稳健、高效、以葡萄糖为原料的CFE系统, 并将其用于生产聚羟基丁酸酯(PHB)的生物塑料, 该系统的性能展现了其有大规模工业化的潜力。同时, Ullah等<sup>[58]</sup>利用无细胞策略合成纤维素的研究结果更形象地体现了这一优势: 以葡萄糖为唯一碳源, 15 d的时间内CFE系统获得了基于葡萄糖消耗量计算的57.68%的纤维素产量, 而传统微生物系统只获得了39.62%的纤维素产量。由此可见, CFE系统在生产纤维素方面凭借更高的能源利用率和

更高的产量，非常具有工业化的潜力。可以想象，当CFE系统得到大范围应用时，将极大程度促进生物材料的可持续、低成本生产。

除此之外，传统的微生物合成生物材料面临的一个固有挑战是：必须在合成目标产物的同时维持细胞的自身生长代谢。研究人员几乎不可能使细胞正常生长和目标产物的合成都维持在最佳状态，而这极大限制了当前最先进的生物合成技术的各种应用，例如作为目标分子或中间产物的丁醇都应低于约2.5%（体积分数）以维持对细胞无毒的水平<sup>[59]</sup>。不同的是，CFE系统可以适应更苛刻的反应环境，甚至包括直接添加化学试剂、盐、有毒物质和高温等<sup>[31]</sup>。例如，Endoh等<sup>[60]</sup>所构建的CFE系统在80℃下依然有蛋白质合成的活力，并在65℃的最适温度下合成了几丁质酶。

基于以上优势，越来越多以葡萄糖为基质的可持续合成CFE系统被设计出来，并且都表现出了较高的资源利用率，例如乙醇（57%）<sup>[34]</sup>、异丁醇（53%）<sup>[34]</sup>、正丁醇（83%）<sup>[61]</sup>、苹果酸（63%）<sup>[62]</sup>等。几乎可以肯定的是，当CFE系统的优势和相应的应用方法被越来越多地开发出来后，其完全有可能成为可持续生物材料合成的通用平台，并为各种生物材料的低成本、可持续合成提供极大助力（图2）。

CFE系统既可以表达生物酶催化以上生物材料的可持续合成，也可以表达结构蛋白使其自身成为蛋白质材料，这些材料的组成往往具有不同于催化酶的特征，例如：赋予生物材料抗菌性质的抗菌肽（AMP），大多由带正电的氨基酸组成，对生产宿主有毒<sup>[63]</sup>；具有超强力学性能的蛛丝组分蛋白具有强烈的氨基酸组成偏好，甘氨酸和丙氨酸的含量超过60%<sup>[64]</sup>；具有黏附及自愈性质的贻贝蛋白（MAP）则需要引入多巴等非天然氨基酸<sup>[20]</sup>；糖基化也是关键的翻译后修饰之一，自然界中基于黏附蛋白的生物材料很多都依赖于高度糖基化后的蛋白质<sup>[65]</sup>。得益于过去数十年的发展，CFE系统针对不同的目标，已经制定了多种多样的合成策略<sup>[35, 66-67]</sup>（表2）。

通过这些努力，CFE系统已经基本具备合成多种多样蛋白质材料的能力。以生产对宿主有毒的蛋白质为例，预防细菌感染是新一代生物材料面临的主要挑战之一，一种备受关注的办法是在生物材料上引入抗菌肽（AMP）来制备抗菌材料<sup>[89]</sup>。例如，与AMP共价交联制备的水凝胶是临床上防止皮肤感染的解决方案<sup>[89]</sup>。但AMP本身作为破坏生物膜稳定性而具有毒害作用的物质，传统方法较难合成，而通过CFE系统的努力，冻干的大肠杆菌CFE系统，已成功合成了10种不同的

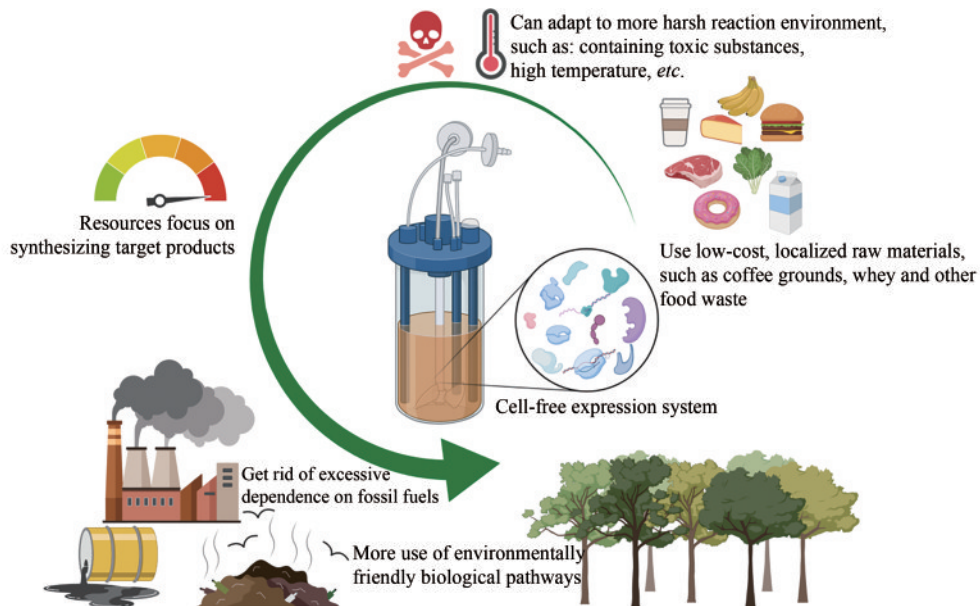


图2 基于无细胞表达系统的可持续生物材料合成策略

Fig. 2 Sustainable biomaterial synthesis strategy based on cell-free expression system

表2 CFE系统针对特殊蛋白质合成的应对方法

Tab. 2 Corresponding methods for special protein synthesis using CFE system

组成生物材料的特殊蛋白质	使CFE系统提高生产力和/或生物活性的方法
对生产宿主有毒的蛋白质	额外的tRNA补充 <sup>[68]</sup> 选择不同的提取物(例如昆虫) <sup>[69]</sup> 连续交换无细胞表达系统 <sup>[70]</sup> 纯化标签以提高溶解度 <sup>[71]</sup>
具有氨基酸组成偏好的蛋白质	稀有tRNA的添加 <sup>[72]</sup> 选择不同的提取物(例如小麦胚芽) <sup>[73]</sup> 用同义密码子替换初始密码子 <sup>[74-75]</sup>
需要分子伴侣或特定化学环境合成的蛋白质	伴侣蛋白, 蛋白质二硫键异构酶(PDI), 还原和氧化的谷胱甘肽(glutathione)调整 <sup>[76]</sup> 前导肽和微粒体囊泡 <sup>[77]</sup> 对于膜蛋白, 加入洗涤剂/表面活性剂 <sup>[78-79]</sup>
含有非天然氨基酸的蛋白质	通过基因组工程消除提取物中的负面效应物, 如释放因子1(RF1)的竞争限制 <sup>[80]</sup> 去除同源tRNA <sup>[81]</sup>
需要糖基化修饰的蛋白质	内切糖苷酶介导的N-糖基化蛋白的制备 <sup>[82-83]</sup> 原核寡糖基转移酶(OST)介导的无细胞糖蛋白生物合成 <sup>[34, 84]</sup> 糖基转移酶(GT)介导的蛋白质糖基化和聚糖加工 <sup>[85-86]</sup>
需要磷酸化的蛋白质	基因组重新编码的大肠杆菌菌株 <sup>[87]</sup>

注: 表中前4种特殊蛋白质合成提升方法参考于文献 [88]。

Note: The first 4 special protein synthesis promotion methods in the table are referenced in the Ref.[88].(This table lists the methods that researchers have developed to improve productivity and/or biological activity in order to synthesize special proteins using the CFE system. These special proteins include proteins that are toxic to the production host, proteins with preference for amino acid composition, proteins that require molecular chaperones or specific chemical environment synthesis, proteins containing UNAAs, proteins that require glycosylation modification, and proteins that require phosphorylation.)

AMP, 并通过大肠杆菌抑菌实验证明了BP100、Cecropin B 和 Cecropin P1 的功能<sup>[90]</sup>。除此之外, 基于CFE系统的平台也为筛选生物活性AMP<sup>[91]</sup>及毒素(如 thermostable direct hemolysin, TDH)提供了新的方法<sup>[92]</sup>。

## 2.2 基于材料的无细胞表达系统性能提升

虽然CFE系统凭借自身优势成为一种快速生产蛋白质的方法, 然而想要利用CFE系统得到高体积产量(超过mg/mL级别)的功能性蛋白质仍然具有挑战性。鉴于几乎所有CFE系统都是液相系统(SPS)——即其基因表达模板是分散在溶液中的<sup>[93]</sup>, Park等开发了一种完全由DNA制成的凝胶<sup>[94]</sup>, 该凝胶支架由基因与分支DNA结构酶促交联形成, 命名为“X-DNA”。DNA连接酶将X-DNA上的回文黏性末端与线性化质粒的黏性末端互补交联, 之后使用这种交联的DNA为唯一成分制备“P-凝胶”<sup>[93]</sup>。这是水凝胶材料首次用于生产功能性蛋白质, 并且产量高达5 mg/mL<sup>[95]</sup>。Ruiz等<sup>[96]</sup>

在此基础上, 进一步设计了基于微流体装置的“P-凝胶”无细胞大规模蛋白质生产平台, 并设想将该平台作为传统活细胞生产系统的强力替代品(目前该平台已商业化)。而Kahn等<sup>[97]</sup>考虑到在很多生物制品中基因不易表达的问题, 设计出了一种新的基于DNA的水凝胶无细胞平台, 以解决蛋白质工程的基本挑战——包括高蛋白质产量、基因组分离和蛋白质展示等。另外关于DNA水凝胶的成本问题, Cui等<sup>[98]</sup>构建了由聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)和DNA制备的低成本混合水凝胶。该水凝胶成本比P-凝胶下降了30余倍, 而蛋白质产量比CFE的SPS提高22.7倍, 除此之外, 经过简单的离心回收后, PEGDA/DNA混合水凝胶还可以在CFE中重复使用10次。与此同时, 研究人员还开发出了黏土与基因混合的水凝胶——Yang等首先证明了黏土水溶液可以在离子溶液中瞬间形成水凝胶<sup>[99]</sup>, 接着通过其水凝胶中盘状结构(纳米盘)具有的带电性来自发地结合表达质粒(两者结合后甚至可以在室温下储存半年), 最后将其用于CFE体系。结果表明, 该水凝胶除了能提高

CFE系统的蛋白产量外，还可以通过添加磁性纳米颗粒（MNP）实现水凝胶的回收与再利用<sup>[100]</sup>。

除了制作与DNA结合的混合水凝胶外，Lee等<sup>[101]</sup>尝试直接向无细胞反应中增添家蚕*Bombyx mori*的丝素蛋白以增加大分子拥挤效应，并成功将CFE系统的蛋白质产量提高了42%。不仅如此，研究人员还尝试了其他将CFE系统与材料相结合的方法，例如：Pardee等<sup>[102]</sup>开创性地提出将CFE系统冷冻干燥到材料上，使基于合成生物学的技术能够以廉价、无菌和非生物的方式用于全球应用。在上述研究报道之后，研究人员对将冷冻干燥的无细胞（FD-CF）反应保存在多孔材料中有了极大的兴趣，因为该技术可以避免使用冷链并在室温下进行全球分配和储存<sup>[103]</sup>。例如近期，Blum等<sup>[104]</sup>探索了数十种多孔基质材料，并展示出水凝胶基质材料具有增强CFE系统蛋白表达的能力，他们预期未来可以设计新的生物材料基质以控制CFE系统的反应速度、产量、稳定性等属性。

借助材料不仅可以提升CFE系统的合成能力以及长期室温储存的能力，还有其他重要的应用方向<sup>[52]</sup>。“从头开始”构建细胞一直是令许多合成生物学研究人员兴奋的一个领域。人们通常将具有多种功能的细胞模拟物称为“人造细胞”（AC）。在人造细胞中，除了内部的CFE系统外，细胞内边界材料和分隔方法也起到关键性作用，例如如何用脂质提供与生物膜相似环境的天然膜；如何用水凝胶来高效分隔CFE系统创造以及延长系统寿命等等。所有人都在期待CFE系统与材料更好

地结合，从而共同加速人造细胞这一先进领域的发展<sup>[105]</sup>。

在这里本文展示了材料与CFE系统结合后各种令人惊叹的创新型设计（图3）。相信未来随着各种材料与CFE系统巧妙结合，更多新颖的应用形式将不断涌现。

### 2.3 无细胞表达系统赋予材料新功能及应用

智能材料是一种能响应外部特定刺激而改变其一种或多种特性的新型功能材料<sup>[106]</sup>，也是现代高技术材料发展的重要方向之一。智能材料的已有应用包括：智能玻璃（通过快速的光响应而改变颜色的油墨）<sup>[107]</sup>，可以检测外部刺激的织物传感器<sup>[108]</sup>和水凝胶药物递送系统<sup>[109]</sup>等。目前研究人员已经开发出的智能水凝胶可根据pH、光照或温度等变化来改变其自身物理以及其他特性<sup>[110]</sup>，例如我们实验室先前报道的具有双重热敏特性的，基于蜘蛛牵引丝的保守C端域组装的蛋白质水凝胶<sup>[111]</sup>；进一步开发的可按需调节的，双热敏蛋白水凝胶<sup>[112]</sup>；以及通过赋予导电性而开发出，可实时监测人类活动的穿戴式传感器的混合水凝胶<sup>[113]</sup>。然而，与生物领域内观察到的多响应、多功能的材料相比，人类设计和构建材料的能力仍然有限，仍然有很多需要从生命系统中学习的东西，而仿生学领域将为重新开发新型智能材料提供重要启示<sup>[114]</sup>。秉承此想法，Whitfield等<sup>[115]</sup>建议通过无细胞策略，将活细胞中的生命现象重新

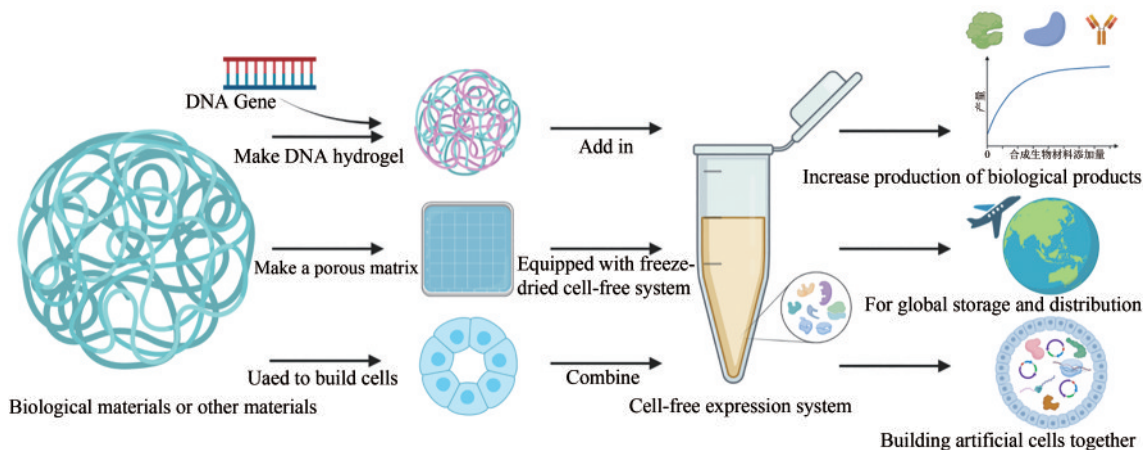


图3 基于材料的无细胞表达系统性能提升

Fig. 3 Performance improvement of cell-free expression system aided by materials

展现到水凝胶中，从而赋予水凝胶材料智能化。他们使用该系统设计和构建了一种无细胞水凝胶材料，该材料可以响应外源刺激并改变其底盘材料的结构特性。类似地，有研究人员合成了一种化学交联的透明的水凝胶：1,4-丁二醇二缩水甘油醚（HA:BDDE）<sup>[116]</sup>，通过无细胞合成裂解酶并对HA:BDDE进行消化来改变材料结构特性。有趣的是，在此过程中水凝胶大小和颜色的变化可以通过肉眼直接观察到。目前有3种在水凝胶中大规模引入CFE系统的常用方法：①CFE系统和水凝胶聚合物直接结合；②先将水凝胶冻干，再使用含水的CFE系统重构水凝胶；③先将CFE系统冷冻干燥，再使用含水（液体）的水凝胶重构。Whitfield等<sup>[115]</sup>通过以上3种方法测试了12种具有不同结构和化学特征的水凝胶与CFE系统结合的能力，结果表明CFE系统与大部分水凝胶材料都是可以结合的，并且在某些情况下，作为基质的水凝胶借助分子拥挤效用，反而可以增加CFE系统表达。更重要的是，这些结果启发了人们通过CFE系统表达功能性的酶来激活材料性质变化，从而开发出基于CFE系统和水凝胶结合的智能材料的思路。

随着研究的深入，以生物材料为基质，结合CFE系统的生物传感器的开发也成为了可能。研究人员将编码基因电路的CFE系统冻干并嵌入纸或其他潜在材料中，制成了无细胞纸基生物传感器。这些生物传感器可以在室温下保存几个月之久<sup>[102-103, 117]</sup>，并在加入水或其他液体样品激活后，可以通过预先编程好的程序产生可监测的信号输出，以此来检测相关分子（例如汞）或某些疾病的生物标志物<sup>[43, 118]</sup>。除此之外，无细胞生物传感器还可以用来检测病毒RNA，如工程化的基于无细胞的生物传感器可以区分不同的埃博拉病毒<sup>[102]</sup>和寨卡病毒株<sup>[119]</sup>，并且可以用来检测冠状病毒，例如SARS-CoV和2019 n-CoV<sup>[120]</sup>。针对2020年爆发的新型冠状病毒（COVID-19）肺炎疫情，Liu等<sup>[121]</sup>将基于CFE系统的纸基生物传感器评述为新开发的检测SARS-CoV-2的有效方法。CFE系统与材料结合的这项应用具有十分深远的意义——通常情况下，传染性疾病对于世界上较贫困地区人的健康威胁更大，而使用基于CFE系统的生物传感器这一更廉价和便携的测试工具，可以彻底改变检测和处

理这些致命疾病的方式，以此减少它们对人类健康的威胁，从而挽救更多的生命<sup>[18]</sup>。

在一些创新性的工作中，CFE系统还被用于制造自组装蛋白质微阵列，并将其作为核酸可编程蛋白质阵列（NAPPA）技术<sup>[122]</sup>，蛋白质原位阵列（PISA）技术<sup>[123]</sup>和其他基于蛋白质阵列的方法<sup>[124-126]</sup>——此概念通过使用His标签进一步扩展到蛋白质合成和选择性固定<sup>[127-129]</sup>。目前这些系统已成功应用于药物发现和蛋白质工程<sup>[128, 130]</sup>。例如Benítez-Mateos等<sup>[131]</sup>最近描述了一种便携式工具包，只需将DNA、固定材料和CFE系统混合，即可将CFE系统和蛋白质固定化集成在一起（in one pot），具体地说，它们通过开发一组可与CFE系统和固体材料一起使用的质粒，从而协调蛋白质合成和固定，并按需制造基于蛋白质的生物材料。这项技术完全便携，因为它不需要专门的设备或基础设施，所以可以扩展到通过合成和固定相应酶和抗体的结合蛋白来制造功能性生物材料。目前，该合成生物平台已成为按需制造治疗、诊断和传感生物材料的多功能工具。

总而言之，CFE系统为材料的智能化和功能化提供了一条全新的路径（图4）。可以想象，当CFE系统拓展到更多生物材料的设计中后，将赋予生物材料愈加丰富的特性从而满足市场不断增长的新需求。

## 2.4 无细胞策略加速新型生物材料的开发

合成生物学的研究思路是使用工程上常用的迭代设计-构建-测试（DBT）循环，尽可能节约生物设计、生产和应用的时间<sup>[132]</sup>。然而，尽管人们开发了许多合成生物学工具，例如基因拷贝数调整<sup>[133]</sup>和组合转录调控<sup>[134]</sup>来加速DBT循环，由于细胞本身的复杂性，该研究思路仍面临众多挑战。相比之下，凭借可以直接使用线性DNA（即PCR产物）作为转录模板，进而绕过费时费力的基因克隆和细胞转化步骤；没有细胞膜和细胞壁的边界从而有利于监测和控制转录、翻译过程的开放系统等优势<sup>[135]</sup>，无细胞原型设计策略可以更轻松地集成到设计周期中<sup>[52]</sup>。除此之外，无细胞表达蛋白质的流程也非常适合自动化，已有研究成功

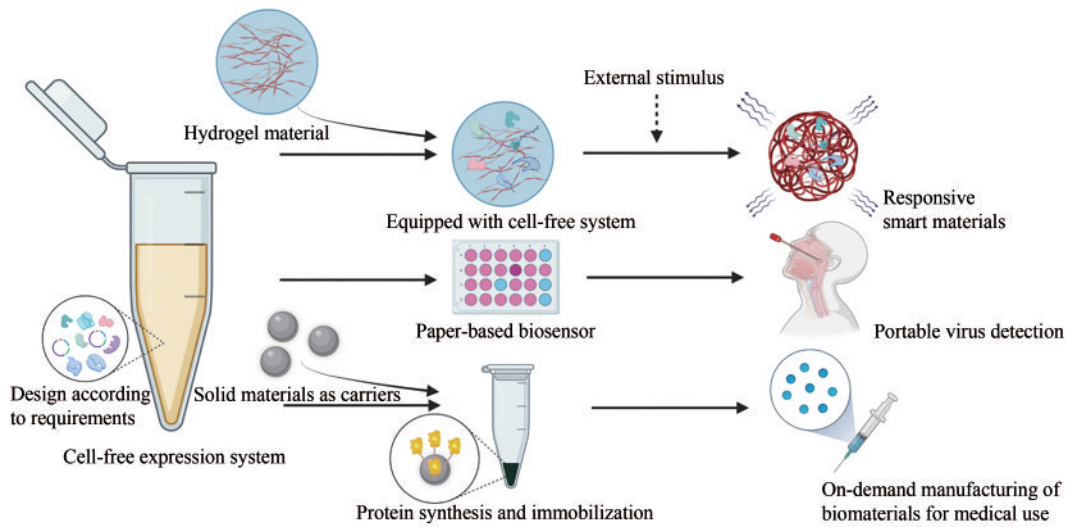


图4 无细胞策略赋予材料新功能及应用

Fig. 4 Cell-free strategy endows materials with new functions for various applications

地利用声学液体处理机器人，快速地建立了大规模、小体积 ( $\leq 10 \mu\text{L}$ ) 的原型无细胞反应体系，并将其用于表征非模型微生物宿主基因表达的调控元件（启动子、转录因子）<sup>[136]</sup>，以此建立代替传统组织培养和流式细胞的检测方法<sup>[137]</sup>。同时，微流体技术<sup>[138]</sup>、液滴阵列技术<sup>[139]</sup>也已应用于实现基于无细胞策略的高通量筛选。通过以上方法还可以大批量测试调控元件或代谢酶，并为生物材料的合成提供更优化的路径<sup>[52]</sup>。除此之外，CFE系统还可以用来高通量筛选生物分子，研究表明CFE系统在筛选有毒或不溶性蛋白质<sup>[140]</sup>、减少所需时间<sup>[141]</sup>和反应体积<sup>[142]</sup>等方面，有着显著的优势。使用体外无细胞策略以高通量形式筛选和进化生物分子的技术可分为体外展示和芯片技术两大类，这些技术都拓宽了CFE系统对生物分子高通量筛选方面的应用<sup>[143]</sup>。同时将这些数据输入到生物数据库中，用于机器学习，可加速新材料的发现和设计从而筛选、设计出具有更优性能的生物材料<sup>[144]</sup>。

目前，各种基础和应用科学都需要将非天然氨基酸（UNAA）引入蛋白质<sup>[145]</sup>。在前沿应用中，引入UNAA会产生具有新的功能和结构特征的蛋白质，这是传统的20种天然氨基酸无法实现的<sup>[146]</sup>。由于具有克服传统方法中UNAA难以跨越细胞膜运输、非天然生物成分的细胞毒性和低效率等问题，CFE系统已被公认为是高效整合UNAA的强大测试和生物制造平台<sup>[130]</sup>。除此之外，如上文所述，CFE

系统还拥有作为良好的高通量筛选平台并加快非天然蛋白质工程的设计-构建-测试循环的能力<sup>[147]</sup>。所有的这些优势都会将CFE系统发展为强大的、简单的、灵活的合成非天然蛋白质的平台。例如Albayrak等<sup>[148]</sup>设计的基于无细胞平台的UNAA引入技术，可用于蛋白质和小分子聚合物的合成，进而制造一类新的支架或生物材料。总的来说，无细胞策略已为生物材料的高通量筛选提供了一个强大的生物平台，该平台在生物材料设计周期方面的优势，极有可能加速一系列新型生物材料的筛选、设计与合成（图5）。

### 3 总结与展望

人类对于材料需求的迅速增加直接导致了森林的过度砍伐、对化石燃料的过分依赖，以及遗留大量自然难以降解的材料垃圾<sup>[145]</sup>。因此，迫切需要一种绿色、低成本、可持续的材料合成策略<sup>[52]</sup>，而无细胞合成生物材料的策略则有望成为以上难题的重要解决方案。于此，本文首先介绍了CFE系统以本地食物垃圾为原料生产生物塑料以及乳酸的例子，并总结了CFE系统在能源高效利用和适应更苛刻反应条件方面的优势，以凸显CFE系统用于可持续生物材料制造的巨大潜力。接着，本文展示了基于材料的CFE系统性能提升，例如多种增加CFE系统蛋白质产量的DNA凝胶、

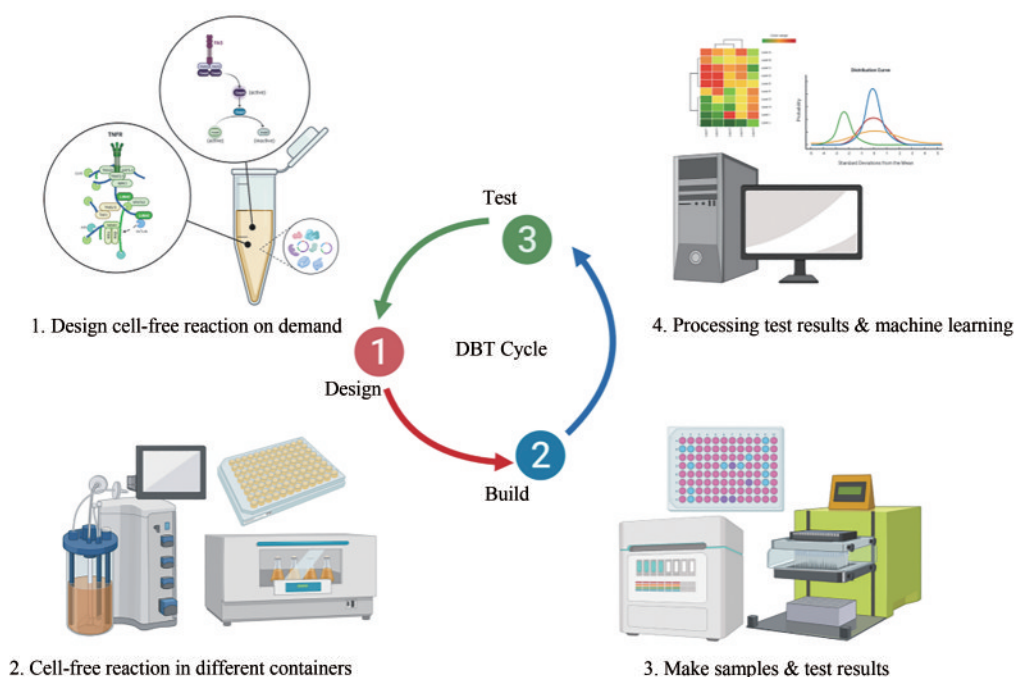


图5 无细胞策略用于加速生物材料的DBT循环

Fig. 5 Cell-free strategy is used to accelerate the DBT cycle of biomaterials

保存在多孔材料上的冷冻干燥的CFE系统以及类似人造生命的“人造细胞”，并相信这些借助材料的CFE系统设计在未来可能大大提升CFE系统的合成效率<sup>[131]</sup>、降低成本并展现新的应用前景。随后，本文列举了CFE系统赋予各种材料智能化和功能化的策略，通过与水凝胶等材料结合，可以制造出具有外界刺激响应性的智能水凝胶以及可以在室温下存储的生物传感器，从而大大拓展了材料的应用范围<sup>[29]</sup>。最后，本文展示了CFE系统对于加快生物材料设计开发的DBT循环以及帮助非天然氨基酸引入方面所具有的显著优势，并期待其为新型生物材料的开发提供一个快速、高效的平台。

虽然CFE系统已经在不同场景中获得了引人注目的成就<sup>[43]</sup>，研究人员也已证明CFE系统是克服传统细胞固有局限性的有效工具，但是挑战依然存在。其一是成本<sup>[32]</sup>，因为无细胞本身作为无法自我复制的系统，并且需要额外补充酶、能源物质和辅因子等，而这种较为昂贵的生产成本成为限制其发展的首要原因<sup>[40]</sup>。其二，CFE系统的寿命即反应持续时间较短<sup>[32]</sup>，并且作为一个年轻的系统，人们对其基本特征和工作原理还缺乏深刻的理解，在非常依赖实际操作数据支持的工程

生产中，CFE系统的使用仍然缺乏经验。其三，在与材料相结合的应用中，CFE系统的生物材料制造能力尚未得到充分评估和理解，并且用于进行无细胞反应的材料也未能得到充分利用<sup>[29]</sup>。反映在更具体的实例中，无细胞与材料相结合的挑战仍有很多，例如在已有研究中，Lee等<sup>[101]</sup>虽然向CFE系统中添加丝素蛋白并提高了CFE系统的产量，但是却并没有达到改善无细胞反应其他性能的预期目标。而基于材料的冷冻干燥的CFE系统，除了耐用性和稳定性存在挑战外，还存在现有制取细胞裂解物方法昂贵且属于劳动密集型、不利于全球性推广的问题<sup>[103]</sup>。其四，蛋白质的翻译后修饰在很多基于蛋白质的生物材料中非常重要，这些修饰包括糖基化、磷酸化、泛素化、亚硝基化、甲基化、乙酰化等等，而CFE系统本身翻译后修饰的能力较弱，所以仍需要更多的方法来进一步改善其在此方面的能力<sup>[32]</sup>。其五，还存在非天然氨基酸多样性带来的生物不相容性以及嵌入效率低等问题<sup>[145]</sup>。所以，虽然CFE系统在生物材料研究中已获得较为广泛的应用，但如果想让该领域在实际生产中获得更大的经济效益和社会效益，人们仍有很长的路要走。幸运的是，研究人员已经开始着手制定各种方案来解决以上挑

战,例如制定CFE系统的定量评价机制以及用于定性评价的基本属性特征、开发通用的无细胞模型、设计更稳定的能源供给及辅因子回收系统等等<sup>[29-30]</sup>。

CFE系统作为一个新兴的研究方向,尽管有着众多不成熟的地方以及有待进一步解决的问题,但相信其具备的独特优势一定会为生物材料的创新设计及应用提供强大的支撑。随着相关研究的进一步深入,可以基于CFE系统更快速地开发新型生物材料,并且以更低的成本、环境友好的方式生产出来,从而保护人们赖以生存的地球环境;同时,不断开发出的与无细胞结合的智能材料,例如病毒检测生物传感器等,将在极大程度上保障人类的健康。总而言之,无细胞策略在生物材料研究中的应用,作为一个有前景、有意义的新兴方向,非常值得研究人员进一步地探索与挖掘,不仅为了阐述更多存在于细胞中的生命机理,更为了保护我们深爱的地球家园以及家园里生活的每一个值得珍惜的生命。

### 参 考 文 献

- [1] MARTIN J D. What's in a name change? [J]. *Physics in Perspective*, 2015, 17(1): 3-32.
- [2] CALLISTER JR W D, RETHWISCH D G. *Fundamentals of materials science and engineering: an integrated approach*[M]. John Wiley & Sons, 2020.
- [3] CROWTHER T W, GLICK H B, COVEY K R, et al. Mapping tree density at a global scale[J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 201-205.
- [4] ARMSTRONG E. Voluntary greenhouse gas reporting[J]. *Environmental Quality Management*, 2011, 20(4): 29-42.
- [5] ERIKSEN M, LEBRETON L C M, CARSON H S, et al. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250, 000 tons afloat at sea[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e111913.
- [6] LENTON T M, ROCKSTRÖM J, GAFFNEY O, et al. Climate tipping points—too risky to bet against[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 592-595.
- [7] MENG F K, ELLIS T. The second decade of synthetic biology: 2010—2020[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5174.
- [8] MAPLESTON P. New technologies for a greener industry[J]. *Plastics Engineering*, 2008, 64(1): 10-15.
- [9] COLWILL J, RAHIMIFARD S, CLEGG A. Eco-design tool to support the use of renewable polymers within packaging applications[C]// *Glocalized Solutions for Sustainability in Manufacturing*. Springer, 2011: 160-165.
- [10] AKSAKAL R, MERTENS C, SOETE M, et al. Applications of discrete synthetic macromolecules in life and materials science: recent and future trends[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(6): 2004038.
- [11] YADAV P, YADAV H, SHAH V G, et al. Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: a systematic review[J]. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 2015, 9(9): ZE21-ZE25.
- [12] WEINER S, ADDADI L, WAGNER H D. *Materials design in biology*[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2000, 11(1): 1-8.
- [13] SCHMALZ G. *Determination of biocompatibility*[M]//*Biocompatibility of dental materials*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 13-43.
- [14] GAD S C, GAD-MCDONALD S. *Biomaterials, medical devices, and combination products: biocompatibility testing and safety assessment*[M]. CRC Press, 2015.
- [15] ANDERSON J, STRELKOWA N, STAN G B, et al. Engineering and ethical perspectives in synthetic biology. Rigorous, robust and predictable designs, public engagement and a modern ethical framework are vital to the continued success of synthetic biology[J]. *EMBO Reports*, 2012, 13(7): 584-590.
- [16] CHURCH G M, ELOWITZ M B, SMOLKE C D, et al. Realizing the potential of synthetic biology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(4): 289-294.
- [17] KELWICK R, MACDONALD J T, WEBB A J, et al. Developments in the tools and methodologies of synthetic biology[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2014, 2: 60.
- [18] KHAMBHATI K, BHATTACHARJEE G, GOHIL N, et al. Exploring the potential of cell-free protein synthesis for extending the abilities of biological systems[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 248.
- [19] MOORE S J, MACDONALD J T, WIENECKE S, et al. Rapid acquisition and model-based analysis of cell-free transcription-translation reactions from nonmodel bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(19): E4340-E4349.
- [20] MARTIN R W, DES SOYE B J, KWON Y C, et al. Cell-free protein synthesis from genomically recoded bacteria enables multisite incorporation of noncanonical amino acids[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1203.
- [21] BOWIE J U, SHERKHANOV S, KORMAN T P, et al. Synthetic biochemistry: the bio-inspired cell-free approach to commodity chemical production[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(7): 766-778.
- [22] HODGMAN C E, JEWETT M C. Cell-free synthetic biology: thinking outside the cell[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14

- (3): 261-269.
- [23] SMOLKE C D, SILVER P A. Informing biological design by integration of systems and synthetic biology[J]. *Cell*, 2011, 144(6): 855-859.
- [24] YUE K, ZHU Y Y, KAI L. Cell-free protein synthesis: chassis toward the minimal cell[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 315.
- [25] BUCHNER E. Alkoholische gahrung ohne hefezellen[J]. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1897, 30(1): 117-124.
- [26] NIRENBERG M W, MATTHAEI J H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1961, 47(10): 1588-1602.
- [27] GREGORIO N E, LEVINE M Z, OZA J P. A user's guide to cell-free protein synthesis[J]. *Methods and Protocols*, 2019, 2(1): 24.
- [28] LIU W Q, ZHANG L K, CHEN M Z, et al. Cell-free protein synthesis: recent advances in bacterial extract sources and expanded applications[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 141: 182-189.
- [29] GARENNE D, NOIREAUX V. Cell-free transcription-translation: engineering biology from the nanometer to the millimeter scale[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 58: 19-27.
- [30] SWARTZ J R. Expanding biological applications using cell-free metabolic engineering: an overview[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 156-172.
- [31] WILDING K M, SCHINN S M, LONG E A, et al. The emerging impact of cell-free chemical biosynthesis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 53: 115-121.
- [32] LU Y. Cell-free synthetic biology: engineering in an open world [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(1): 23-27.
- [33] DUDLEY Q M, KARIM A S, JEWETT M C. Cell-free metabolic engineering: biomufacturing beyond the cell[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(1): 69-82.
- [34] GUTERL J K, GARBE D, CARSTEN J, et al. Cell-free metabolic engineering: production of chemicals by minimized reaction cascades[J]. *ChemSusChem*, 2012, 5(11): 2165-2172.
- [35] CARLSON E D, GAN R, HODGMAN C E, et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(5): 1185-1194.
- [36] 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[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2013(79): e50762.
- [37] CALHOUN K A, SWARTZ J R. An economical method for cell-free protein synthesis using glucose and nucleoside monophosphates[J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(4): 1146-1153.
- [38] LIU D V, ZAWADA J F, SWARTZ J R. Streamlining *Escherichia coli* S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis[J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(2): 460-465.
- [39] JEWETT M C, CALHOUN K A, VOLOSHIN A, et al. An integrated cell-free metabolic platform for protein production and synthetic biology[J]. *Molecular Systems Biology*, 2008, 4(1): 220.
- [40] SMOLSKAYA S, LOGASHINA Y A, ANDREEV Y A. *Escherichia coli* extract-based cell-free expression system as an alternative for difficult-to-obtain protein biosynthesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 928.
- [41] KWON Y C, JEWETT M C. High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8663.
- [42] DIDOVYK A, TONOOKA T, TSIMRING L, et al. Rapid and scalable preparation of bacterial lysates for cell-free gene expression[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(12): 2198-2208.
- [43] SILVERMAN A D, KARIM A S, JEWETT M C. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21(3): 151-170.
- [44] GUTTEL R. Chemical process technology. von J. A. Moulijn, M. Makkee, A. E. van Diepen[J]. *Chemie Ingenieur Technik*, 2014, 86(5): 585.
- [45] HOOCK M, TANG X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—a review[J]. *Energy Policy*, 2013, 52: 797-809.
- [46] CHAE T U, CHOI S Y, KIM J W, et al. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 47: 67-82.
- [47] CHUBUKOV V, MUKHOPADHYAY A, PETZOLD C J, et al. Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals[J]. *NPJ Systems Biology and Applications*, 2016, 2: 16009.
- [48] STEPHANOPOULOS G. Challenges in engineering microbes for biofuels production[J]. *Science*, 2007, 315(5813): 801-804.
- [49] HASUNUMA T, OKAZAKI F, OKAI N, et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 513-522.
- [50] NIELSEN C, RAHMAN A, REHMAN A U, et al. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1338-1352.
- [51] STRONG P J, LAYCOCK B, MAHAMUD S N S, et al. The opportunity for high-performance biomaterials from methane[J]. *Microorganisms*, 2016, 4(1): 11.
- [52] KELWICK R J R, WEBB A J, FREEMONT P S. Biological materials: the next frontier for cell-free synthetic biology[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 399.

- [53] KELWICK R, RICCI L, CHEE S M, et al. Cell-free prototyping strategies for enhancing the sustainable production of polyhydroxyalkanoates bioplastics[J]. *Synthetic Biology*, 2018, 3(1): ysy016.
- [54] PETROLL K, KOPP D, CARE A, et al. Tools and strategies for constructing cell-free enzyme pathways[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(1): 91-108.
- [55] KOPP D, WILLOWS R D, SUNNA A. Cell-free enzymatic conversion of spent coffee grounds into the platform chemical lactic acid[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 389.
- [56] CASTRO-AGUIRRE E, IÑIGUEZ-FRANCO F, SAMSUDIN H, et al. Poly(lactic acid)—mass production, processing, industrial applications, and end of life[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107: 333-366.
- [57] OPGENORTH P H, KORMAN T P, BOWIE J U. A synthetic biochemistry module for production of bio-based chemicals from glucose[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(6): 393-395.
- [58] ULLAH M W, UL-ISLAM M, KHAN S, et al. Innovative production of bio-cellulose using a cell-free system derived from a single cell line[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132: 286-294.
- [59] GREEN E M. Fermentative production of butanol—the industrial perspective[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(3): 337-343.
- [60] ENDOH T, KANAI T, SATO Y T, et al. Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(2): 186-195.
- [61] KRUTSAKORN B, HONDA K, YE X T, et al. *In vitro* production of *n*-butanol from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 20: 84-91.
- [62] YE X T, HONDA K, MORIMOTO Y, et al. Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(1): 34-40.
- [63] YOUNT N Y, YEAMAN M R. Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2005, 12(1): 49-67.
- [64] XU M, LEWIS R V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(18): 7120-7124.
- [65] SAHIN KEHRIBAR E, ISILAK M E, BOZKURT E U, et al. Engineering of biofilms with a glycosylation circuit for biomaterial applications[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(10): 3650-3661.
- [66] PEREZ J G, STARK J C, JEWETT M C. Cell-free synthetic biology: engineering beyond the cell[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(12): a023853.
- [67] CHONG S R. Overview of cell-free protein synthesis: historic landmarks, commercial systems, and expanding applications[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2014, 108: 16.30.1-16.30.11.
- [68] SALEHI A S M, SMITH M T, BENNETT A M, et al. Cell-free protein synthesis of a cytotoxic cancer therapeutic: onconase production and a just-add-water cell-free system[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(2): 274-281.
- [69] ORTH J H C, SCHORCH B, BOUNDY S, et al. Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*[J]. *Toxicon*, 2011, 57(2): 199-207.
- [70] MARTEMYANOV K A, SHIROKOV V A, KURNASOV O V, et al. Cell-free production of biologically active polypeptides: application to the synthesis of antibacterial peptide cecropin[J]. *Protein Expression and Purification*, 2001, 21(3): 456-461.
- [71] CHEN H Q, FAN L M, XU Z N, et al. Efficient production of soluble human beta-defensin-3-4 fusion proteins in *Escherichia coli* cell-free system[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(3): 423-428.
- [72] MU J B, AWADALLA P, DUAN J H, et al. Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(1): 126-130.
- [73] TSUBOI T, TAKEO S, ARUMUGAM T U, 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.
- [74] AHN J H, KEUM J W, KIM D M. High-throughput, combinatorial engineering of initial codons for tunable expression of recombinant proteins[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(5): 2107-2113.
- [75] PARK Y J, LEE K H, BAEK M S, et al. High-throughput engineering of initial coding regions for maximized production of recombinant proteins[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017, 22(5): 497-503.
- [76] STECH M, KUBICK S. Cell-free synthesis meets antibody production: a review[J]. *Antibodies*, 2015, 4(1): 12-33.
- [77] STECH M, NIKOLAEVA O, THORING L, et al. Cell-free synthesis of functional antibodies using a coupled *in vitro* transcription-translation system based on CHO cell lysates[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12030.
- [78] SACHSE R, DONDAPATI S K, FENZ S F, et al. Membrane protein synthesis in cell-free systems: from bio-mimetic systems to bio-membranes[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(17): 2774-2781.
- [79] BÄCKLUND E, IGNATUSHCHENKO M, LARSSON G. Suppressing glucose uptake and acetic acid production increases membrane protein overexpression in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10: 35.
- [80] MICHEL-REYDELLET N, CALHOUN K, SWARTZ J. Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modifica-

- tion of the *Escherichia coli* genome[J]. *Metabolic Engineering*, 2004, 6(3): 197-203.
- [81] GAN Q L, FAN C G. Increasing the fidelity of noncanonical amino acid incorporation in cell-free protein synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*, 2017, 1861(11): 3047-3052.
- [82] GIDDENS J P, LOMINO J V, AMIN M N, et al. Endo-F3 glycosynthase mutants enable chemoenzymatic synthesis of core-fucosylated triantennary complex type glycopeptides and glycoproteins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(17): 9356-9370.
- [83] FAN S Q, HUANG W, WANG L X. Remarkable transglycosylation activity of glycosynthase mutants of *endo*-D, an *endo*- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase from *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(14): 11272-11281.
- [84] NATARAJAN A, JAROENTOMECHAI T, CABRERA-SÁNCHEZ M, et al. Engineering orthogonal human O-linked glycoprotein biosynthesis in bacteria[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(10): 1062-1070.
- [85] KIGHTLINGER W, DUNCKER K E, RAMESH A, et al. A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5404.
- [86] LIU F, VIJAYAKRISHNAN B, FARIDMOAYER A, et al. Rationally designed short polyisoprenol-linked PglB substrates for engineered polypeptide and protein *N*-glycosylation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(2): 566-569.
- [87] OZA J P, AERNI H R, PIRMAN N L, et al. Robust production of recombinant phosphoproteins using cell-free protein synthesis[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8168.
- [88] JIN X, HONG S H. Cell-free protein synthesis for producing 'difficult-to-express' proteins[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 138: 156-164.
- [89] DONDAPATI S K, STECH M, ZEMELLA A, et al. Cell-free protein synthesis: a promising option for future drug development[J]. *BioDrugs*, 2020, 34(3): 327-348.
- [90] BENCI J L, XU B H, QIU Y, et al. Tumor interferon signaling regulates a multigenic resistance program to immune checkpoint blockade[J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1540-1554.e12.
- [91] XIE Q H, MATSUNAGA S, WEN Z S, et al. *In vitro* system for high-throughput screening of random peptide libraries for antimicrobial peptides that recognize bacterial membranes[J]. *Journal of Peptide Science: an Official Publication of the European Peptide Society*, 2006, 12(10): 643-652.
- [92] RAGHUNATH P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in vibrio parahaemolyticus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5: 805.
- [93] PARK N, KAHN J S, RICE E J, et al. High-yield cell-free protein production from P-gel[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(12): 1759-1770.
- [94] UM S H, LEE J B, PARK N, et al. Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel[J]. *Nature Materials*, 2006, 5(10): 797-801.
- [95] PARK N, UM S H, FUNABASHI H, et al. A cell-free protein-producing gel[J]. *Nature Materials*, 2009, 8(5): 432-437.
- [96] RUIZ R C H, KIATWUTHINON P, KAHN J S, et al. Cell-free protein expression from DNA-based hydrogel (P-gel) droplets for scale-up production[J]. *Industrial Biotechnology*, 2012, 8(6): 372-377.
- [97] KAHN J S, RUIZ R C H, SUREKA S, et al. DNA microgels as a platform for cell-free protein expression and display[J]. *Bio-macromolecules*, 2016, 17(6): 2019-2026.
- [98] CUI J H, WU D, SUN Q, et al. A PEGDA/DNA hybrid hydrogel for cell-free protein synthesis[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 28.
- [99] YANG D Y, PENG S M, HARTMAN M R, et al. Enhanced transcription and translation in clay hydrogel and implications for early life evolution[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3165.
- [100] JIAO Y, LIU Y, LUO D, et al. Microfluidic-assisted fabrication of clay microgels for cell-free protein synthesis[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(35): 29308-29313.
- [101] LEE M S, HUNG C S, PHILLIPS D A, et al. Silk fibroin as an additive for cell-free protein synthesis[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(3): 145-154.
- [102] PARDEE K, GREEN A A, FERRANTE T, et al. Paper-based synthetic gene networks[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 940-954.
- [103] PARDEE K. Perspective: solidifying the impact of cell-free synthetic biology through lyophilization[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 138: 91-97.
- [104] BLUM S M, LEE M S, MGBOJI G E, et al. Impact of porous matrices and concentration by lyophilization on cell-free expression[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(5): 1116-1131.
- [105] CHO E, LU Y. Compartmentalizing cell-free systems: toward creating life-like artificial cells and beyond[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(11): 2881-2901.
- [106] PATRICK J F, ROBB M J, SOTTOS N R, et al. Polymers with autonomous life-cycle control[J]. *Nature*, 2016, 540(7633): 363-370.
- [107] SUCH G K, EVANS R A, DAVIS T P. Rapid photochromic switching in a rigid polymer matrix using living radical polymerization[J]. *Macromolecules*, 2006, 39(4): 1391-1396.
- [108] CASTANO L M, FLATAU A B. Smart fabric sensors and e-textile technologies: a review[J]. *Smart Materials and Structures*, 2014, 23(5): 053001.
- [109] HOARE T R, KOHANE D S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges[J]. *Polymer*, 2008, 49(8): 1993-2007.
- [110] AHN S K, KASI R M, KIM S C, et al. Stimuli-responsive polymer gels[J]. *Soft Matter*, 2008, 4(6): 1151.

- [111] QIAN Z G, ZHOU M L, SONG W W, et al. Dual thermosensitive hydrogels assembled from the conserved C-terminal domain of spider dragline silk[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(11): 3704-3711.
- [112] SONG W W, QIAN Z G, LIU H, et al. On-demand regulation of dual thermosensitive protein hydrogels[J]. *ACS Macro Letters*, 2021, 10(4): 395-400.
- [113] HU X, XIA X X, HUANG S C, et al. Development of adhesive and conductive resilin-based hydrogels for wearable sensors[J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(9): 3283-3293.
- [114] SARIKAYA M, TAMERLER C, JEN A K Y, et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology[J]. *Nature Materials*, 2003, 2(9): 577-585.
- [115] WHITFIELD C J, BANKS A M, DURA G, et al. Cell-free genetic devices confer autonomic and adaptive properties to hydrogels[EB/OL]. *bioRxiv*, 2019. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2019.12.12.872622v1>
- [116] KENNE L, GOHIL S, NILSSON E M, et al. Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels — definitions and analytical methods[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 91(1): 410-418.
- [117] SMITH M T, BERKHEIMER S D, WERNER C J, et al. Lyophilized *Escherichia coli*-based cell-free systems for robust, high-density, long-term storage[J]. *BioTechniques*, 2014, 56(4): 186-193.
- [118] LEE K H, KIM D M. *In vitro* use of cellular synthetic machinery for biosensing applications[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1166.
- [119] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [120] AHN D G, JEON I J, KIM J D, et al. RNA aptamer-based sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein[J]. *The Analyst*, 2009, 134(9): 1896-1901.
- [121] LIU R, FU A S, DENG Z X, et al. Promising methods for detection of novel coronavirus SARS-CoV-2[J]. *View*, 2020, 1(1): e4.
- [122] RAMACHANDRAN N, RAPHAEL J V, HAINSWORTH E, et al. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 535-538.
- [123] HE M Y, TAUSSIG M J. Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and *in situ* immobilisation (PISA method)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(15): e73.
- [124] BHIDE M, NATARAJAN S, HRESKO S, et al. Rapid *in vitro* protein synthesis pipeline: a promising tool for cost-effective protein array design[J]. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(6): 1236-1245.
- [125] HE M Y, LIU H, TURNER M, et al. Detection of protein-protein interactions by ribosome display and protein *in situ* immobilisation[J]. *New Biotechnology*, 2009, 26(6): 277-281.
- [126] HE M Y, STOEVE SANDT O, TAUSSIG M J. *In situ* synthesis of protein arrays[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(1): 4-9.
- [127] LEE K H, KWON Y C, YOO S J, et al. Ribosomal synthesis and *in situ* isolation of peptide molecules in a cell-free translation system[J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, 71(1): 16-20.
- [128] 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[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(9): 1605-1610.
- [129] BYUN J Y, LEE K H, LEE K Y, et al. In-gel expression and *in situ* immobilization of proteins for generation of three dimensional protein arrays in a hydrogel matrix[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(5): 886-891.
- [130] KARIG D K, BESSLING S, THIELEN P, et al. Preservation of protein expression systems at elevated temperatures for portable therapeutic production[J]. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2017, 14(129): 20161039.
- [131] BENÍTEZ-MATEOS A I, LLARENA I, SÁNCHEZ-IGLESIAS A, et al. Expanding one-pot cell-free protein synthesis and immobilization for on-demand manufacturing of biomaterials[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(3): 875-884.
- [132] MISIRLI G, NGUYEN T, MCLAUGHLIN J A, et al. A computational workflow for the automated generation of models of genetic designs[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(7): 1548-1559.
- [133] LIAN J Z, JIN R, ZHAO H M. Construction of plasmids with tunable copy numbers in *Saccharomyces cerevisiae* and their applications in pathway optimization and multiplex genome integration[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(11): 2462-2473.
- [134] DU J, YUAN Y B, SI T, et al. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(18): e142.
- [135] JIANG L H, ZHAO J R, LIAN J Z, et al. Cell-free protein synthesis enabled rapid prototyping for metabolic engineering and synthetic biology[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(2): 90-96.
- [136] MOORE S J, MACDONALD J T, WIENECKE S, et al. Rapid acquisition and model-based analysis of cell-free transcription-translation reactions from nonmodel bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(19): E4340-E4349.
- [137] KOPNICZKY M B, CANAVAN C, MCCLYMONT D W, et al. Cell-free protein synthesis as a prototyping platform for mammalian synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(1): 144-156.

- [138] SWANK Z, LAOHAKUNAKORN N, MAERKL S J. Cell-free gene-regulatory network engineering with synthetic transcription factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(13): 5892-5901.
- [139] ZHANG Y, MINAGAWA Y, KIZOE H, et al. Accurate high-throughput screening based on digital protein synthesis in a massively parallel femtoliter droplet array[J]. *Science Advances*, 2019, 5(8): eaav8185.
- [140] SAWASAKI T, OGASAWARA T, MORISHITA R, et al. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(23): 14652-14657.
- [141] KANTER G, YANG J H, VOLOSHIN A, et al. Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines[J]. *Blood*, 2007, 109(8): 3393-3399.
- [142] FAN J Z, VILLARREAL F, WEYERS B, et al. Multi-dimensional studies of synthetic genetic promoters enabled by microfluidic impact printing[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(13): 2198-2207.
- [143] CONTRERAS-LLANO L E, TAN C. High-throughput screening of biomolecules using cell-free gene expression systems[J]. *Synthetic Biology*, 2018, 3(1): ysy012.
- [144] GUBERNATIS J E, LOOKMAN T. Machine learning in materials design and discovery: examples from the present and suggestions for the future[J]. *Physical Review Materials*, 2018, 2(12): 120301.
- [145] GAO W, CHO E, LIU Y Y, et al. Advances and challenges in cell-free incorporation of unnatural amino acids into proteins[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 611.
- [146] HONG S H, NTAI I, HAIMOVICH A D, et al. Cell-free protein synthesis from a release factor 1 deficient *Escherichia coli* activates efficient and multiple site-specific nonstandard amino acid incorporation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(6): 398-409.
- [147] MANKOWSKA S A, GATTI-LAFRANCONI P, CHODORGE M, et al. A shorter route to antibody binders *via* quantitative *in vitro* bead-display screening and consensus analysis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36391.
- [148] ALBAYRAK C, SWARTZ J R. Direct polymerization of proteins[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(6): 353-362.



通讯作者：夏小霞(1978—)，女，教授，博士生导师。研究方向为蛋白材料合成生物学、人工细胞器、生物大分子自组装等。  
E-mail: xiaoxiaxia@sjtu.edu.cn



第一作者：吉博涛(1997—)，男，博士研究生。研究方向为无细胞表达系统合成生物材料。  
E-mail: botao-ji@sjtu.edu.cn