特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-093

无细胞基因表达系统在人工细胞中的应用

黄芳情[1]，刘晚秋[1]，李健[1, 2, 3]
（[1] 上海科技大学物质科学与技术学院，上海 201210；[2] 上海科技大学先进医用材料与医疗器械全国重点实验室，上海 201210；[3] 上海临床研究中心，上海 201210）

摘要：人工细胞是自下而上合成生物学的重要研究载体，旨在通过整合区室边界、遗传信息与生化反应网络，探索人工分子系统实现自我维持与自主运行的条件。无细胞基因表达系统可在体外实现遗传信息的转录与翻译，是赋予人工细胞可编程功能的关键模块。本文以脂质体和聚合物囊泡为主要对象，以液滴、相分离凝聚体及凝胶微区室为互补平台，综述无细胞基因表达系统在人工细胞构建中的研究进展，重点讨论表达体系的类型与选择、区室边界构建与体系封装、遗传程序执行、能量再生、空间组织及区室间通信等。尽管相关研究已在功能模块构建与集成方面取得进展，人工细胞的持续稳定运行仍受封装异质性、反应寿命有限以及能量与底物供给不足等因素制约。同时，多模块集成中的转录与翻译资源竞争、能量分配失衡及功能耦合不足，使遗传程序驱动的自主生长与分裂循环仍面临挑战。未来研究应以模块间的功能耦合与系统协同为核心，协调基因表达需求与资源供给，兼顾区室边界的稳定性、选择性通透性与物质交换能力，并结合单区室定量表征、微流控供料及人工智能辅助优化，提高人工细胞构建的可重复性与运行稳定性。此外，应建立与具体应用场景相适应的安全评价体系，为人工细胞由功能模块集成向系统自主运行发展提供参考。

关键词：无细胞基因表达；人工细胞；区室化；遗传程序；合成生物学

中图分类号：Q81　　**文献标志码：**A

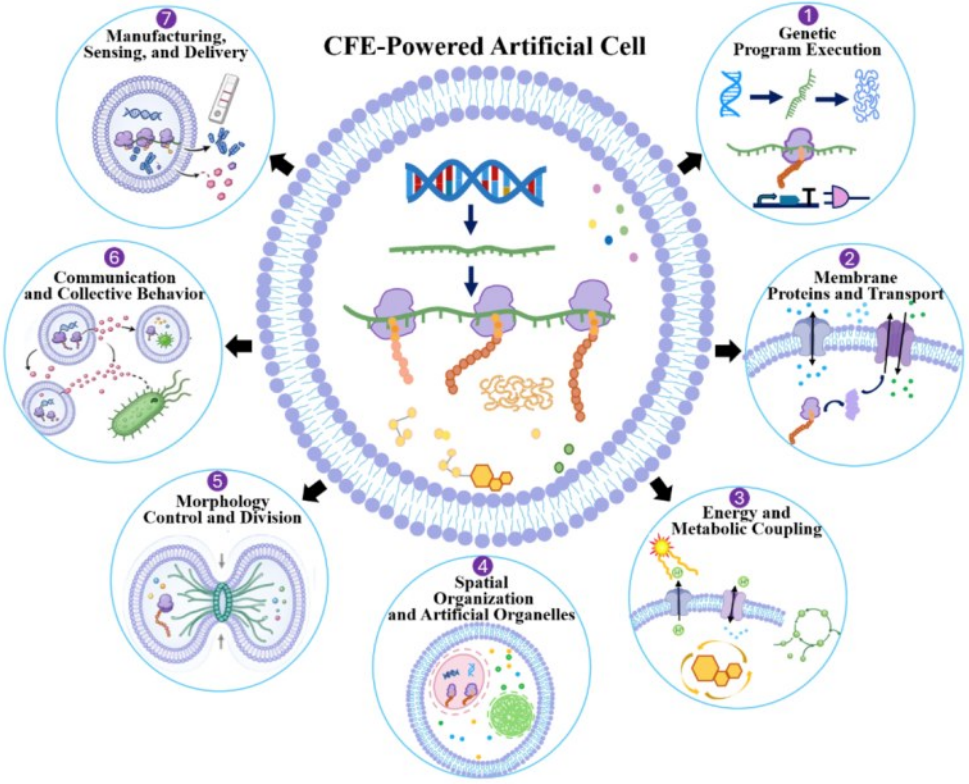
Application of cell-free gene expression systems in artificial cells

HUANG Fangqing[1], LIU Wanqiu[1], LI Jian[1, 2, 3]
([1]*School of Physical Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China*; [2]*State Key Laboratory of Advanced Medical Materials and Devices, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China*; [3]*Shanghai Clinical Research and Trial Center, Shanghai 201210, China*)

Abstract: Artificial cells are an important platform for bottom-up synthetic biology, aiming to explore the conditions required for self-maintenance and autonomous operation of artificial molecular systems by integrating compartment boundaries, genetic information, and biochemical reaction networks. Cell-free gene expression systems enable transcription and translation in vitro and serve as key modules for endowing artificial cells with programmable

收稿日期：2026-09-01 修回日期：2026-11-10
基金项目：国家自然科学基金（32571664）；上海市自然科学基金项目（24ZR1451000）
引用本文：黄芳情，刘晚秋，李健. 无细胞基因表达系统在人工细胞中的应用[J]. 合成生物学，2026，7. DOI：10.12211/2096-8280.2026-093
Citation：HUANG Fangqing，LIU Wanqiu，LI Jian. Application of cell-free gene expression systems in artificial cells[J]. Synthetic Biology Journal，2026，7. DOI：10.12211/2096-8280.2026-093

functions. This review focuses primarily on liposomes and polymersomes, with droplets, phase-separated condensates, and gel-based microcompartments considered as complementary platforms. It summarizes recent advances in the application of cell-free gene expression systems to artificial cell construction, highlighting the types and selection of expression systems, compartment boundary construction and system encapsulation, genetic program execution, energy regeneration, spatial organization, and intercompartmental communication. Despite progress in the construction and integration of functional modules, sustained and stable operation of artificial cells remains constrained by encapsulation heterogeneity, limited reaction lifetimes, and insufficient energy and substrate supply. Moreover, competition for transcriptional and translational resources, imbalanced energy allocation, and insufficient functional coupling during multimodule integration continue to hinder autonomous growth and division cycles driven by genetic programs. Future research should prioritize functional coupling and coordination among modules, align gene expression demands with resource availability, and balance compartment boundary stability and selective permeability with material exchange requirements. Integrating quantitative characterization at the single-compartment level, microfluidic feeding, and artificial intelligence-assisted optimization may improve the reproducibility of artificial cell construction and the stability of system operation. In addition, safety assessment frameworks tailored to specific application scenarios should be established to support the transition of artificial cells from functional module integration toward autonomous system operation.



Keywords: cell-free gene expression; artificial cells; compartmentalization; genetic programs; synthetic biology

人工细胞也称合成细胞（artificial cells 或 synthetic cells），是指通过自下而上的方式，将膜边界、遗传信息、酶促反应网络和物质及能量交换等模块整合起来，构建能够执行特定生物化学

过程的工程化分子系统。人工细胞研究的长期目标不仅是重构生命系统的部分结构与功能，更在于探索边界、遗传信息和代谢网络能否协同作用，使系统在外界提供必要物质和能量的条件下维持自身运行，并逐步获得组分更新和自我复制能力[1-4]。自下而上的合成生物学为这一目标提供了重要的研究思路和技术路径[5-10]。

在人工细胞的诸多功能模块中，无细胞基因表达（cell-free gene expression， CFE）系统承担将遗传信息转化为功能分子的任务。膜边界则提供相对独立的反应空间，代谢反应提供物质与能量；CFE通过转录和翻译生成调控蛋白、酶及膜功能的组分，使遗传程序能够影响区室的物质交换、催化活动和响应行为。CFE将天然细胞中的转录—翻译过程从完整活细胞背景中分离出来，同时保留遗传模板到mRNA和蛋白质的完整过程[11-14]。人工细胞整合相关研究表明，遗传线路可以通过驱动无细胞表达，生成各类功能分子（如酶、孔道蛋白或信号肽）。这些功能分子既可以在区室内部参与自身代谢或结构的重塑，也可以跨越边界，参与细胞内外环境的物质交换与信号传递[15-19]。因此，CFE可视为连接遗传信息与人工细胞系统行为的执行层，而不是被动的蛋白质生产模块。

CFE在人工细胞中的应用大致经历了三个层次：早期研究主要关注封装表达，即将DNA、核糖体、酶、氨基酸和能量底物等组分封装进脂质体，证明蛋白质可以在细胞大小的封闭空间内合成[16，17]；随后是功能模块构建，例如表达孔道蛋白、膜结合蛋白或调控线路[18，20-22]；当前研究则进一步将基因表达与物质交换、能量供给和信号沟通耦合起来[23-26]，并探索空间组织对表达的调控[27-29]。但是功能模块的分别实现并不等于系统已能自主维持，人工细胞能否持续运行取决于表达产物是否正确折叠、组装和定位，也取决于跨膜通量、能量再生、底物补给以及组分更新能否相互匹配。

本文不将CFE仅视为蛋白质生产工具，而是将其定位为人工细胞的遗传操作系统（图1）：遗传模板经转录—翻译产生功能分子，功能分子改变区室的边界性质、物质通量、能量利用或信号响应，而这些变化又可能反馈影响后续表达。围绕这一逻辑，本文首先介绍CFE的原理、体系选择及运行约束；随后讨论边界材料和封装过程对表达的影响；继而综述遗传程序执行、膜蛋白合成、能量与代谢耦合、空间组织、形态调控、群体通信及应用转化；最后总结展望从单项功能走向系统自主运行所需的设计原则与关键挑战。

1 无细胞基因表达体系

无细胞基因表达（CFE）系统是指在没有完整活细胞参与的情况下，利用细胞提取物或纯化生物大分子完成转录、翻译及相关生化反应的体外体系。主要成分包括DNA或RNA模板、RNA聚合酶、核糖体、tRNA、氨酰-tRNA合成酶、翻译因子、氨基酸、核苷酸、盐离子、能量再生底物和辅因子等。其本质是将天然细胞中高度耦合的中心法则过程从细胞生长背景中剥离出来，使其成为可直接调控的体外生化模块[11-14]。这一特征使CFE系统特别适合人工细胞研究：它比活细胞简单，便于调节和建模；又比单一酶反应复杂，足以执行遗传程序并产生多样化功能输出。CFE因此处于可定量分析的生化反应与能够执行复杂遗传程序的系统行为之间，是人工细胞的核心执行层。

目前人工细胞研究中常用的CFE系统主要包括粗提取物体系和重构体系。粗提取物体系通常来源于大肠杆菌、小麦胚芽、兔网织红细胞、酵母或其他生物，保留了大量天然转录翻译组分和部分代谢酶。典型的大肠杆菌无细胞表达体系具有成本相对较低、蛋白表达能力较高、对复杂遗传线路兼容性较好等优点，已广泛用于体外遗传线路构建和人工细胞蛋白表达[18，30-32]。对于人工细胞而言，粗提取物体系的优势在于能够支持快速迭代和多模块测试；其不足则是成分复杂、批次差异明显、背景反应较多，不利于精确建模和机制解析。

重构体系以基于重组元件的蛋白质合成（Protein synthesis Using Recombinant Elements，PURE）系统为代表，PURE系统由纯化的翻译因子、氨酰-tRNA合成酶、核糖体、tRNA、能量底

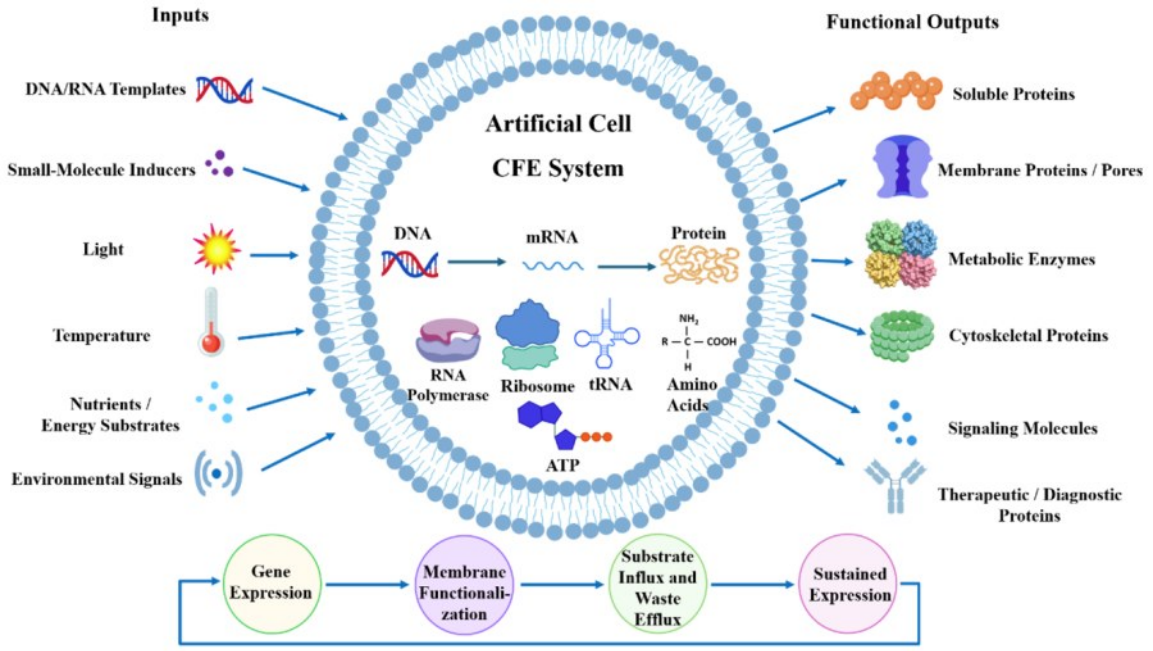


图1 无细胞基因表达系统作为人工细胞遗传操作系统的功能框架

Fig. 1 Functional framework of cell-free gene expression systems as genetic operating systems in artificial cells

物及其他必要组分构成，最早由Shimizu等建立[11]。相比粗提取物体系，PURE系统组分明确、背景核酸酶和蛋白酶较少，适合研究最小转录翻译体系、膜蛋白合成与插入、非天然氨基酸掺入和自再生表达等问题[33, 34]。但是PURE系统的局限是成本较高，且缺少粗提取物中保留的内源性代谢网络，能量和核苷酸供给通常更依赖预先设计的反应配方。相比之下，粗提取物体系通常保留部分糖酵解酶及内膜囊泡，可利用葡萄糖、麦芽糊精等底物再生ATP，但其组分复杂、批次差异较大。两类体系的选择应取决于具体研究目标，复杂线路筛选和高产量合成可优先考虑粗提取物，而机制解析和定量控制则优先选择PURE系统。

粗提取物体系与PURE系统并不存在绝对优劣，对人工细胞而言，试管中的表达性能并不能直接代表封装后的表现，膜材料可能吸附或排斥特定组分，封装过程可能改变组分比例，且小体积区室的缓冲能力和底物储量有限。因而体系选择除考虑产量、成本与组分可控性外，还应评估其与目标膜材料、封装方法、供料方式及目标蛋白的兼容性。

能量供给是决定CFE系统性能的关键因素，细胞内转录翻译依赖复杂代谢网络维持ATP、GTP、NTP和还原力，而体外体系通常通过磷酸烯醇式丙酮酸、肌酸磷酸、3-磷酸甘油酸、麦芽糊精、葡萄糖或多聚磷酸等底物再生能量[34-38]。粗提取物能够利用部分内源代谢酶，而标准PURE体系不具备完整代谢网络，主要依赖配方中设定的能量再生组分。进入囊泡后，这些一般约束会被进一步放大如有限体积、较弱的缓冲能力和受限扩散会加速底物耗竭、pH变化及副产物积累。因此，囊泡内表达的寿命不仅由初始反应配方决定，也取决于膜通透性、外部供料和代谢副产物能否得到控制。

此外，CFE系统是一个资源受限的非平衡反应网络，其中的核糖体、RNA聚合酶、NTP、氨基酸、能量底物和分子伴侣之间存在耦合，不同基因模板之间也会因共享资源而产生竞争。基因线路在活细胞中常受表达负载影响，在无细胞体系中同样存在类似问题，但这种负载更容易被定量分析和调控[39-43]。这种资源竞争在人工细胞多模块集成时也尤其重要，因为能量再生、蛋白合成、基因线路和代谢酶表达可能同时争用有限资源。虽然空间分隔有助于改变局部浓度或减少部分串扰，但若不同区室仍然共享底物或需要跨膜交换，资源耦合并不会自动消失。因此，应将表达负载、

模板比例和表达时序与能量供给、物质通量共同设计，并通过单模块与多模块对照定量判断系统的问题出在何处。

2 人工细胞边界与无细胞基因表达系统封装

人工细胞中的无细胞表达反应并不是孤立发生的，而是受到边界材料、封装方法、膜通透性和外部环境的共同影响。因此，在讨论无细胞表达系统的功能应用之前，有必要首先明确人工细胞边界类型及其与表达系统之间的耦合关系。

人工细胞并不是一个单一类型的体系，而是一类以细胞样结构和功能为目标的工程化微系统。根据边界材料、形成机制和制备方式不同，可分为脂质体人工细胞[16]、聚合物囊泡人工细胞[44]、油包水液滴[27]、相分离液滴[28]、凝胶微腔[29]和微流控反应器[45]等[46, 47]。本文将具有明确膜边界、能够容纳并组织生化反应的脂质体和聚合物囊泡作为主要讨论对象。其他几种类型则作为研究区室化、空间组织或供料过程的互补平台，这些平台具有不同的边界性质，不会认为它们都具有膜边界或具备同等程度的细胞功能（图2a、b）。脂质体由磷脂双层构成，通常较接近天然细胞膜环境，有利于膜蛋白重构，但膜稳定性、通透性及脂质组成会影响表达和蛋白活性；聚合物囊泡可提供更高的机械稳定性和可调的膜厚度、通透性，但其疏水层和界面性质可能影响蛋白嵌入及小分子交换[48, 49]。所以在具体研究中应根据实际情况慎重选择，人工细胞的长期目标是使信息、代谢和自组织过程相互耦合，逐步获得自我维持与自主运行能力[15, 50]。

人工细胞的构建通常涉及边界、内容物、物质交换和遗传程序四个方面。边界决定体系是否具有相对独立的内部环境；内容物决定其能够执行哪些化学或生物过程；通量决定体系能否与外部交换小分子、能量和信号；程序则决定其能否根据内部状态或外界刺激改变行为。早期人工细胞多重视边界和内容物，例如在囊泡中封装酶、DNA或荧光标记物；而当前人工细胞越来越强调通量与程序，尤其是如何让膜蛋白、代谢反应和遗传线路协同工作[8, 9, 21, 51]。

边界制备方法会直接影响无细胞表达效果。薄膜水化法操作简单，但囊泡尺寸分布宽、封装效率不均；乳液转移法和双乳液微流控能够获得更高封装率和更均一的粒径，却可能引入油相残留、膜组成偏差或界面稳定剂影响[52-54]（图2c、d）。封装均一性不仅是粒径问题，还涉及每个区室内CFE组分浓度、DNA拷贝数和组分比例的随机差异，这些差异会放大为表达阳性率和表达动力学的差别。缓解上述问题的方法包括优化封装配方与制备参数、采用微流控制备获得单分散区室、在单区室水平定量测量模板与表达产物，并结合随机封装模型区分体积效应、模板抽样效应和反应动力学差异。评价时不应只报告群体平均荧光，还应尽可能报告粒径分布、表达阳性区室比例及单区室随时间变化的表达信号。

人工细胞边界不应仅被视为被动容器，而应成为与CFE相互作用的功能界面，封闭膜结构有助于形成内部微环境，但也限制底物输入和产物输出。若没有跨膜通量，封装的无细胞表达系统通常只能进行短时批式反应[25]。通过表达孔道蛋白、转运蛋白或膜结合蛋白，人工细胞可以建立可调节的物质交换[16]；通过表达骨架蛋白或膜重塑蛋白，人工细胞可以改变形态和力学性质；通过表达信号分子或释放调控物[20, 21]，人工细胞还可以参与群体通信。因此，无细胞表达系统与人工细胞边界之间的关系应从装入转向耦合。

评价人工细胞不能只看其是否具有细胞样形态，还应关注其能否实现功能运行以及不同功能模块之间的动态耦合。本文所讨论的人工细胞并不意味着所有体系都已具备自我维持、自主运行或自我复制能力；CFE使人工细胞能够按照遗传程序产生和调节所需的功能分子[18, 19]，但这些分子能否正常发挥作用，还取决于其表达水平、折叠状态、膜上的整合方式与空间取向，以及功能能否实现和组分能否得到补充。只有在这些环节与能量供应、物质交换和边界稳定性相互协调时，系统才可能由静态封装体系向动态运行体系发展。

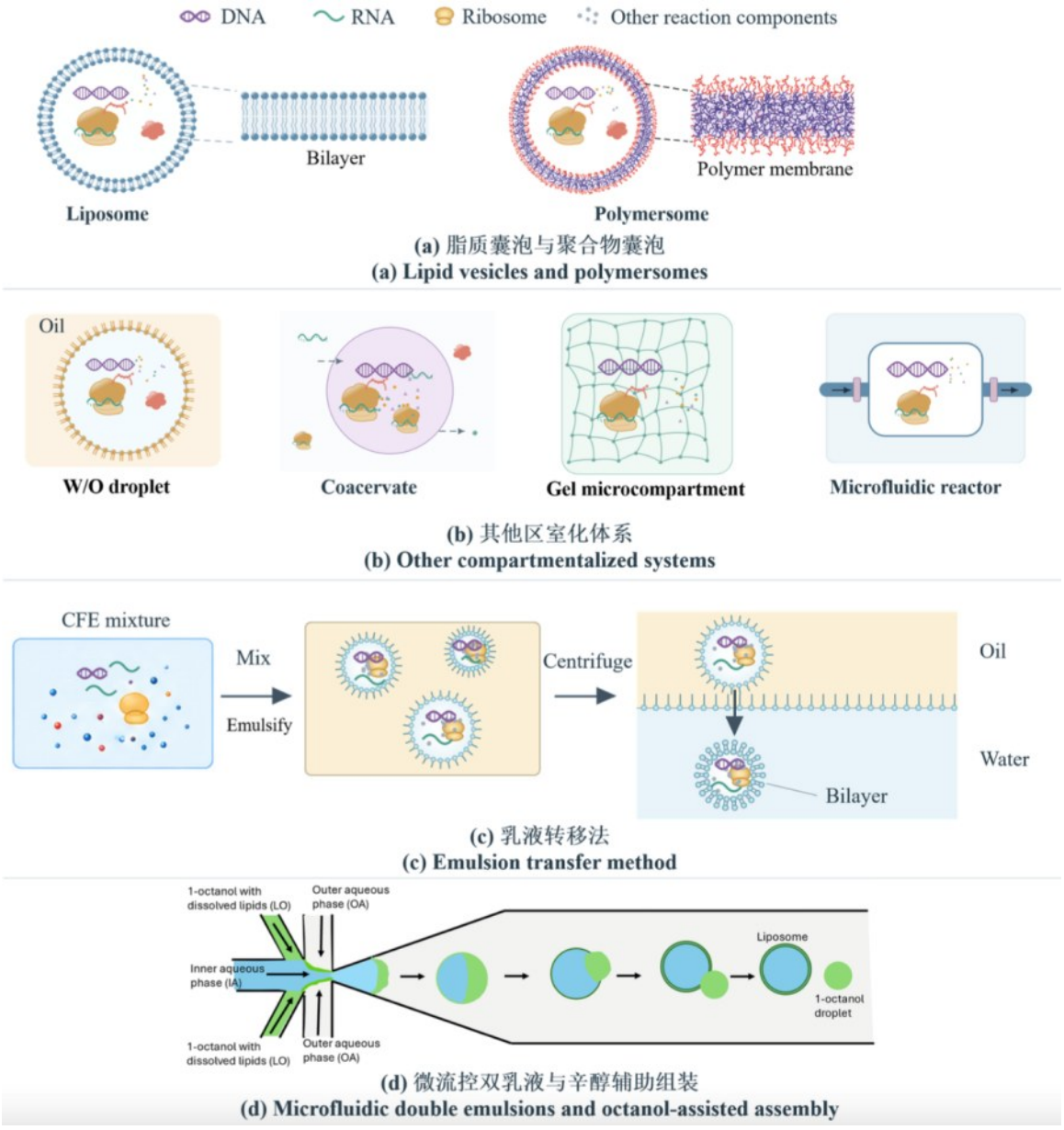


图2 人工细胞构建中的边界类型与CFE包封方法

Fig. 2 Boundary types and methods for CFE encapsulation in artificial cell construction

3 无细胞基因表达系统在人工细胞中的应用

3.1 作为遗传程序执行平台

无细胞基因表达系统在人工细胞中最基础的应用是表达报告蛋白和功能蛋白，Noireaux和Libchaber构建的囊泡生物反应器证明，转录和翻译反应可以在脂质囊泡内运行，并通过原位表达α-溶血素形成孔道、促进小分子交换，为延长囊泡内表达提供了实验基础[16]。随后Noireaux等提出了以磷脂囊泡为区室、以无细胞基因表达系统为内部反应机制的人工细胞构建思路，并通过膜蛋白表达等实验探索了逐步赋予囊泡细胞样功能的可能性[17]。Shin和Noireaux开发的大肠杆菌转录—翻译工具箱使体外遗传线路构建更为便利，并被广泛用于合成基因线路和人工细胞研究[18]。Adamala等将不同遗传电路分别封装于合成最小细胞中，实现了电路间通信和级联反应，显示无细胞表达系统可以在人工边界内执行调控功能[20]。

无细胞基因表达系统在遗传程序层面具有三个优势。第一，模板输入灵活，质粒、线性DNA、PCR片段甚至RNA模板都可用于快速测试[55，56]；第二，反应环境可控，便于系统研究启动子强度、核糖体结合位点、DNA浓度和降解标签对表达动力学的影响[18，30，31]。第三，无细胞表达系统便于与数学模型结合，可用资源受限模型、转录翻译动力学模型和随机模型解释表达噪声和线路行为[40-42]。Gonzales等利用双乳液微流控获得单分散合成细胞群体，并比较了普通溶液体系和封装微区室中无细胞表达反应的动力学差异，他们发现膜环境和单颗粒差异会显著改变表达过程[57]。这说明，人工细胞中的基因表达不能简单外推至试管反应，必须将膜边界、体积限制和扩散过程纳入模型。

封装无细胞表达系统的人工细胞不仅可用于运行遗传线路，也可作为活细胞线路设计之前的体外测试平台。活细胞中线路行为受复制数、细胞周期、降解途径、生长状态和内源调控影响，同一构件在不同宿主中可能表现不同；无细胞体系则可以在较低背景复杂度下测试启动子、核糖体结合位点、转录因子、RNA开关和降解标签。Niederholtmeyer等在无细胞体系中实现了稳态网络，随后又进一步将无细胞体系用于遗传环形振荡器的快速正向工程，这些都说明了体外线路测试能够缩短设计、构建、测试这一整个过程的周期[40，41]。当这些线路进一步被封装进人工细胞时，研究人员可以比较开放试管反应和封闭细胞样环境之间的差异，从而识别膜和空间限制带来的系统效应。

3.2 膜蛋白原位合成与跨膜物质交换

人工细胞要从封闭微反应器转变为动态系统，必须解决物质供给和产物输出问题。脂质膜对大多数亲水分子和生物大分子具有屏障作用，这既是细胞边界的基础，也是人工细胞功能受限的重要原因。CFE使人工细胞能够在区室内部原位合成膜功能组分，α-溶血素是实现跨膜交换的代表性例子，Noireaux和Libchaber将CFE系统封装于磷脂囊泡内，通过表达α-溶血素形成膜孔，促进小分子跨膜交换，并将蛋白质表达时间延长至约4天[16]。这一研究将膜孔形成与内部表达体系的持续运行联系起来，说明膜通透性的改变不仅影响物质运输，也会影响人工细胞内部反应的持续时间。

不同类型的膜蛋白为人工细胞赋予了不同的功能。α-溶血素属于β桶状孔道蛋白，可在脂质体膜上形成孔道，促进小分子跨膜交换[16]；MscL则是机械敏感通道，可将膜张力变化转化为通道开放响应，为构建力学刺激响应系统提供了基础[22]。除跨膜物质交换和刺激感知外，蛋白质与脂质膜之间的相互作用也可用于调控人工细胞形态。例如，MreB可在膜内侧聚合形成皮层样结构，并在膜分子拥挤的作用下促进脂质体由球形向杆状转变[58]；FtsZ可在脂质体中组装成环状结构并产生收缩力[52]，其弯曲原丝（protofilament）还能够诱导膜弯曲[39]。这些研究表明，膜相关蛋白不仅能够介导跨膜物质交换和刺激响应，还可通过结构组装调控人工细胞的形态。然而，上述成果采用了不同的蛋白质制备与功能重构策略，并非均源于CFE原位表达。目前，通过CFE原位表达并完成功能验证的膜蛋白仍以被动通道和孔道蛋白为主。对于多跨膜转运蛋白和受体，功能实现不仅依赖蛋白质合成，还要求正确的膜整合、拓扑取向及功能构象形成。尽管相关研究已探索其无细胞合成与重构的可行性，不同蛋白的功能验证程度仍不一致，尚需结合具体体系开展进一步评估[59，60]。

膜蛋白还为遗传程序与人工细胞的外部环境建立联系提供了途径，Lentini等构建的人工细胞能够响应茶碱核糖开关并表达α-溶血素，释放IPTG以调控天然大肠杆菌行为，展示了人工细胞与天然细胞之间化学信息翻译的可能性[21]。Garamella等构建的适应性合成细胞将机械敏感通道MscL、诱导型基因线路和MreB表达联系起来，实现了渗透压刺激下的基因表达和膜内侧结构组装[22]。Hindley等通过重构机械敏感信号通路，进一步展示了膜感知、信号传递与内容物释放之间的功能联系[61]。除此之外，2024年Harjung等利用工程化自转位孔蛋白，使人工细胞能够将内部表达的肽段展示到膜外侧，为遗传编码的膜外功能

化提供了新路线[62]。这些研究表明，膜蛋白不仅能够赋予人工细胞跨膜交换或机械感知能力，还可将环境信号转化为内部响应，或将内部表达产物转化为外部功能。

膜蛋白的功能实现还取决于其能否正确整合到膜中，以及跨膜拓扑结构是否符合预期，天然细胞借助Sec、YidC、SRP等转位和插入系统控制膜蛋白方向[63-66]，而人工细胞中的膜蛋白往往依赖自发插入、预装载膜囊泡或简化转位机制。如果孔道方向、受体外露方向或转运蛋白构象不可控，人工细胞对底物和信号的响应就会出现较大不确定性。与此同时，膜蛋白的原位合成也会受到表达体系本身的限制，疏水性新生肽链若不能及时与膜或适当的辅助组分结合，可能发生聚集或影响核糖体延伸；用于促进膜蛋白溶解、折叠和整合的脂质或去污剂，也可能改变转录翻译反应的效率[59，60]。这使膜蛋白合成不只是表达产量的问题，还涉及蛋白质合成、膜整合和功能形成之间的协调。

3.3 能量供给、代谢耦合与持续表达

大多数封装无细胞基因表达体系属于批式反应（batch reaction），反应启动后底物被消耗，副产物逐渐积累，蛋白质表达通常在数小时内减弱或停止[19，35]。如果人工细胞要具备更接近生命系统的持续运行能力，就必须建立能量和物质通量。早期研究通过在脂质囊泡内表达α-溶血素，使其在膜上形成孔道，促进小分子物质跨膜交换，从而延长囊泡内的表达时间[16]。Nourian等进一步构建了补料型囊泡微反应器，通过外部补料将囊泡内基因表达时间由批式条件下的约2-3 h延长至20 h以上[25]。另外Berhanu等将PURE系统与含有细菌视紫红质和ATP合酶的人工光合细胞器结合，利用光驱动ATP生成支持蛋白质合成，并进一步合成细菌视紫红质及部分ATP合酶组分。这些新合成的蛋白质整合至人工光合细胞器膜上，增强了ATP生成能力，形成了能量再生与蛋白质合成相互促进的正反馈[24]，为能量自主的人工细胞提供了原理验证。Lavickova等在微流控恒化器中构建了部分自再生的合成细胞，通过约每15 min替换20%体积的周期性补料维持反应运行，并利用DNA模板比例优化关键蛋白组分包括氨酰-tRNA合成酶（如AsnRS和LeuRS）及T7 RNA聚合酶的再生，实现了超过一天的持续合成[23]。该研究说明人工细胞中表达组分的持续再生不仅取决于单个组分的合成能力，还需要考虑多组分之间的资源竞争与分配。

在代谢应用方面，无细胞基因表达系统可用于快速原型化代谢途径和多酶级联反应，再将可行模块封装进人工细胞[67-69]。其中，CFE系统主要依赖转录—翻译合成目标蛋白；无细胞代谢工程（cell-free metabolic engineering，CFME）则主要利用粗裂解液中保留的内源代谢酶（含异源表达的关键酶）或外加纯化酶催化代谢通路，不需要依赖转录—翻译过程。Karim和Jewett提出的无细胞代谢工程技术能够加速生物合成途径体外测试与优化[67]。这对人工细胞尤其重要，因为人工细胞内部空间有限，代谢网络从一开始就应按最小可运行模块设计。未来人工细胞中的代谢模块不应只追求产物合成，还应服务于自身维持，例如再生ATP、维持氧化还原平衡、合成膜脂和补充氨基酸。近期关于化学渗透营养转运和光化学脂质合成的研究表明，人工细胞的代谢、跨膜通量与膜生长可以通过非传统路线耦合起来[70，71]。

持续供能并不只是简单补充ATP。转录消耗NTP，翻译消耗GTP和氨酰化能量，蛋白折叠需要伴侣蛋白和适宜离子环境，膜转运还可能依赖质子动力势或离子梯度。不同CFE体系的能量供给方式也有所不同：粗裂解液体系保留部分内源代谢酶，可利用葡萄糖、麦芽糊精等底物进行能量再生[36]；PURE系统缺少完整的内源代谢网络，通常需要额外配置能量再生底物和相关酶组分[72，73]。因此，人工细胞中的能量系统不仅要维持ATP等能量分子的供应，还需要协调氧化还原状态、离子环境、物质转运和副产物清除。例如Berhanu等利用光驱动质子转运促进ATP合成，为蛋白质表达提供能量[24]；Lavickova等通过周期性补料和关键蛋白组分再生，维持合成细胞的持续运行[23]；Nourian等则通过补料型囊泡微反应器延长囊泡内基因表达时间[25]。此外，化学渗透营养转运研究展示了利用跨膜质子电化学梯度驱动谷

氨酸和乳糖摄取的可行性[74]。因此，人工细胞能量模块的关键不在于简单叠加更多能量再生组分，而在于建立能够持续维持表达反应的能量与物质循环。

3.4 空间组织、人工细胞器与相分离调控

天然细胞并非均一溶液，而是通过细胞器、凝聚体和骨架结构实现空间分工，在人工细胞中，无细胞表达系统往往被视为均相反应液，但越来越多研究开始关注空间组织对表达的影响。Aufinger和Simmel构建了凝胶型人工细胞器，用于在无细胞表达反应中形成空间局部化[29]；Tang等在无膜凝聚体原始细胞中实现体外基因表达，展示了相分离体系承载遗传表达的可能性[28]。Robinson等发现无细胞表达形成的无膜细胞器可能抑制翻译，说明相分离结构既可能提供组织化优势，也可能因隔离核糖体或模板而竞争表达资源[75]。Fan等进一步构建了液—液相分离调控无细胞蛋白质合成的人工细胞，表明凝聚相可以作为基因表达反应的调节器，而不是单纯的被动结构[76]。

空间组织应用的核心问题是如何平衡局部浓缩和全局通量，相分离可以富集DNA、RNA或酶，提高局部反应效率；但过强的凝聚也可能隔离核糖体、降低扩散、阻碍产物输出。对人工细胞而言，合理的空间组织应满足三点：在需要的位置增强反应，在需要的时候释放产物，并且不破坏整体资源供给。若多个反应模块均匀混合可能因资源共享而相互干扰；若将模块局部化，则可降低串扰并形成类似细胞器的功能分区。但局部化设计必须考虑扩散距离和底物更新，否则空间隔离会从功能分区变成反应孤岛。

3.5 生长、形态调控与分裂相关模块

人工细胞要接近生命系统，必须从能表达进一步走向能改变自身结构，CFE在这一过程中具有潜在价值，它通过DNA模板表达骨架蛋白及其他功能组分，并调节其表达时序，可以为膜合成、DNA复制、隔膜形成和分裂力产生等过程的阶段化协调提供可能，实现这一目标仍依赖膜增长、物质供给、资源分配和分裂力学之间的协调。因此，本节重点讨论CFE如何为人工细胞的生长、形态调控与分裂提供表达和调控基础，同时结合相关重构研究分析这些过程的实现基础与现有局限。

细胞骨架蛋白和膜重塑蛋白是实现人工细胞形态调控的重要组成部分，Osawa等人研究表明FtsZ弯曲原丝能够对脂质体膜产生弯曲力[35]。此外，MreB能够在囊泡膜内侧聚合形成类似细胞骨架的结构，并促使囊泡由球形向杆状转变[75]；通过诱导表达MreB，还可以将环境刺激与蛋白质表达及膜内侧结构形成联系起来[17]。这些研究为理解蛋白质组装与膜形态及力学性质之间的关系提供了实验基础，但相关重构成果并不等同于CFE驱动的完整形态调控过程。未来可进一步耦合CFE介导的蛋白质表达、骨架组装与膜重塑，探索人工细胞形态的可编程调控。

人工细胞的生长与分裂还涉及膜面积增加、遗传物质复制及其在子区室中的分配，Zhu和Szostak研究了模型原始细胞膜的生长与分裂过程[77]；Kurihara等则将囊泡内DNA扩增与囊泡自繁殖相结合，展示了遗传物质复制与区室增殖之间的联系[78]。此外，光化学合成天然脂质的研究通过原位合成膜脂展示了囊泡形成、生长和分裂的可能性[79]。不过，这些研究主要涉及生长、DNA扩增或膜组分合成等单个过程或部分过程的耦合，也就是说目前人工细胞分裂研究仍处于模块化阶段，已有体系可以分别实现膜生长、膜变形、DNA扩增、FtsZ收缩或脂质合成，但这些模块尚未稳定耦合成连续的细胞周期。

3.6 通信、群体行为与人工多细胞系统

单个人工细胞可以作为微反应器，而多个人工细胞则可能形成群体计算、模式形成和协同行为。无细胞基因表达系统是构建人工细胞通信的重要工具，因为它能够将外界小分子、光、温度或扩散信号转化为蛋白表达，并进一步产生相应的信号分子或功能输出。Karzbrun等在芯片DNA微室中构建可编程人工细胞[80]，Tayar等实现一维耦合人工细胞中的基因表达前沿传播，证明体外

遗传线路可产生空间传播动力学[81]。Dupin和Simmel利用多隔室体外基因线路实现人工细胞间信号传递和分化，显示人工多细胞系统可以通过扩散、孔道和反馈网络产生复杂时空行为[82]。

根据通信对象不同，无细胞表达的人工细胞通信可分为三类：人工细胞之间的通信、人工细胞与天然细胞之间的通信，以及人工细胞群体与外部环境之间的通信[81, 82]。人工细胞之间的通信可用于研究多细胞系统的最小组织和协同调控原理；人工细胞与天然细胞之间的通信则可在不直接改造天然细胞基因组的情况下调节其行为，例如Lentini等利用人工细胞释放的化学信号调控大肠杆菌行为[21]，后续研究进一步展示了人工细胞与天然细胞之间的双向化学通信[83]。除此之外人工细胞还可以感知外部物理信号，并通过无细胞表达系统产生相应的功能输出，例如Monck等构建了温度响应合成细胞，实现基因程序控制的热响应蛋白合成和货物释放，说明外界物理信号也可以被无细胞表达系统转换为功能输出[84]。光激活通信和凝聚体信号通信等研究也为人工细胞通信提供了不同的实现方式[85, 86]。

通信系统的设计需要考虑信号传递的特异性和背景泄漏，信号分子的扩散可能造成不同通信通路之间的串扰，膜通透性也会影响信号分子的释放和接收。因此，人工细胞群体设计需要同时考虑信号分子大小、膜通透性、降解机制、受体灵敏度和空间排列。微流控技术能够控制人工细胞的位置、间距和物质交换条件，为研究信号传播及群体响应提供可控平台[70]。将CFE基因线路与微流控区室化体系相结合，有助于进一步研究人工细胞群体中的信号传递、反馈调控和协同行为。

3.7 生物制造、传感与治疗递送

基于CFE的人工细胞在生物传感、按需制造和可控释放方面具有应用潜力，但在对其进行应用评价时应同时考虑材料降解与残留、遗传物质的失活或清除、产物剂量、释放速率与持续时间，以及目标环境中的非预期相互作用。比如虽然冻干无细胞体系已用于便携式检测和按需制造[87-90]，但这些应用经验并不能直接证明膜包围的人工细胞也已经具备同样的功能和安全性。

在生物制造方面，CFE体系可用于生物合成途径的快速构建、酶功能验证和反应条件优化，为天然产物合成及代谢工程提供了体外原型验证平台[67-69]。与活细胞相比无细胞体系不需要维持细胞生长，可用于测试对细胞生长有抑制作用的反应组分或生物合成途径。在此基础上，将相关酶和代谢途径封装于人工细胞中，有望利用区室化提供局部反应环境，并通过膜通透性调节底物摄取和产物释放，从而构建具有特定生物合成功能的人工细胞。微流控技术和机器学习辅助筛选可进一步用于无细胞反应体系及其功能组分的优化[70, 91]。此外，无细胞糖蛋白生物合成研究也展示了CFE在复杂生物分子制造方面的潜力[92]。

在生物医学应用方面，无细胞表达人工细胞有望用于体外诊断、局部蛋白生产、疫苗递送和可编程材料[87-90, 92-95]。然而，应用转化必须建立在可重复制备、长期稳定储存和安全释放机制之上。即使人工细胞不具备繁殖能力，其表达产物仍可能影响受体细胞或环境；因此，未来面向医学和环境应用时，需要建立从材料降解、DNA失活、产物剂量到释放触发的安全评估。上述研究表明，CFE系统在人工细胞中已形成从遗传程序执行到群体通信和应用转化的多层次应用体系。表1进一步归纳了各应用模块的核心作用、代表性进展及主要瓶颈。

4 总结与展望

无细胞基因表达（CFE）系统使人工细胞从被动封装预制生物分子的反应容器，逐步发展为能够依据遗传模板在运行过程中合成功能组分的可编程分子系统[101, 102]。从早期的囊泡内蛋白表达与孔道功能研究[16, 17]，到遗传线路、膜功能、代谢活动和空间组织的逐步整合，人工细胞的功能范围不断拓展。然而，功能模块数量的增加并不必然意味着系统自主性与稳定性的提升：蛋白质的成功表达不等同于其正确折叠、定位和功能实现，区室边界的完整性也不等同于有效的物质交换能力。当前研究的核心问题正由单个模块的功能验

表1 无细胞基因表达系统在人工细胞中的主要应用模块与关键问题

Table 1 Main application modules and key challenges of cell-free gene expression systems in artificial cells

应用模块	核心作用	代表性进展	主要瓶颈	参考文献
遗传程序执行	将DNA/RNA模板转化为蛋白质和调控网络	囊泡内表达、合成最小细胞遗传线路、单细胞群体动力学测量	资源竞争、表达噪声、批式反应衰减	[16-18, 20, 57]
膜蛋白与跨膜通量	建立物质供给、货物释放和膜外功能化	α-溶血素孔道、MscL响应、自转位膜蛋白展示	折叠/插入效率、方向性、长期稳定性	[21, 22, 59-62, 96]
能量与代谢耦合	维持ATP与底物供应，支持持续表达	光驱动ATP生成、部分自再生系统、营养转运模块	副产物积累、通量不足、模块难以闭环	[24, 34-38, 74, 79]
空间组织与人工细胞器	调节局部浓度和反应分区	凝胶细胞器、无膜细胞器、相分离调控表达	扩散受限、翻译抑制、资源隔离	[28, 29, 75, 76]
形态与分裂相关模块	通过表达或重构骨架蛋白改变边界力学	FtsZ收缩环、MreB膜内结构、细胞骨架功能化合成细胞	尚未形成完整细胞周期	[50, 52, 77, 78, 97]
通信与群体行为	在人工细胞间或人工-天然细胞间传递信息	基因表达前沿传播、人工分化、化学翻译天然细胞信号	多信号正交性、群体稳定性、可预测性	[20, 21, 80-82, 84-86, 98, 99]
生物制造与诊断递送	非活体可编程制造、检测和释放	冻干CFE、CRISPR诊断、按需制造、微流控糖蛋白合成	应用场景和安全评估不足	[49, 71, 92, 94, 95, 100]

证，转向多个模块在共同边界和有限资源条件下的协调运行。这一转变要求以分子系统工程的视角，统筹遗传程序、区室边界、资源供给与功能输出之间的耦合关系[7, 8, 99]。

未来人工细胞的构建应首先明确目标任务，并据此确定模块配置与评价标准，而非单纯追求功能叠加。对于刺激响应释放体系，关键在于信号输入、表达调控与产物释放之间能否形成有效连接，以及释放剂量和响应时间是否满足应用需求[84]；对于持续制造体系，应重点考察底物供给、合成速率、产物积累及其跨边界转运；对于自我维持体系，则需要进一步评估关键组分的更新能力及其对功能衰减的补偿效果。这些任务具有不同的资源需求和性能约束，不宜采用单一指标进行评价。局部反应效率的提高，可能伴随额外的资源消耗或对其他过程的干扰。因此，应从整体任务完成度出发，评估各模块的必要性、资源成本及其相互影响，并将边界状态、表达动态、产物活性和运行寿命纳入统一的定量评价框架。

资源分配是多模块协同设计的关键。通道蛋白、供能酶、结构蛋白和报告元件共享有限的转录与翻译资源，增强某一模块的表达可能压缩其他模块的合成容量，相关表达负载效应已有实验支持[43]。供能模块体现了这一内在权衡：其能够补充ATP，但自身酶组分的合成与维持同样消耗表达资源和底物。空间组织也并非始终有利于表达，凝聚体在富集和重新分配生物分子的同时，可能限制核糖体对RNA的接近与利用，进而影响整体表达效率[75, 76]。因此，模块集成既要关注新增功能，也要核算其建立和维持所需的资源成本。未来可通过调节模板比例、表达强度与启动时序，探索分阶段的资源配置策略，例如优先建立物质交换与供能条件，再将资源逐步转向目标产物合成或结构组分更新。

区室边界与表达体系的匹配，是将分子合成转化为实际功能的另一关键环节。脂质体与聚合物囊泡在力学性质、稳定性和物质交换能力等方面存在差异，材料选择应围绕目标任务所需的边界性能展开，而不应仅以稳定性作为优劣判断标准[48]。对于膜蛋白表达体系，蛋白质合成只是功能形成的起点，还需实现正确的膜插入、拓扑取向和功能结构域定位[103, 104]。对于依赖ATP或跨膜离子梯度的膜蛋白，其取向、底物可及性及能量驱动力之间的匹配尤为重要。膜厚度、脂质电荷、辅助插入组分和蛋白表达速率均可能影响功能性膜蛋白的形成比例。与此同时，正确折叠与稳定性是蛋白质发挥作用的基础，分子伴侣可协助新生多肽链折叠并参与蛋白质稳态调控[105]。因此，评价重点应从总蛋白产量进一步转向具有正确结构、定位和持续活性的蛋白比例，并明确边界环境与蛋白功能之间的关系[93]。

延长人工细胞的运行寿命，需要同时解决物

质供给、能量维持与组分更新问题。跨膜补料为延长预装载表达体系的工作时间提供了实验基础[25, 35]，光驱动ATP再生展示了区室内部持续补充能量的可能性[24]，部分表达组分的再生研究则开始触及系统自我维持的问题[23]。PURE系统的自生成研究进一步拓展了可由体系合成的组分范围，但现阶段其本身仍依赖外部纯化与配制，并需预先提供核糖体等关键组分[106]。因此，可合成组分的增加尚不能等同于自主运行能力的建立。真正的自我维持不仅要求生成新分子，还要求其生成速率足以补偿失活、泄漏及分裂带来的损失，并与核酸复制、膜材料增长和功能组分继承相协调。DNA复制与脂质合成的整合已为此提供了重要起点[26, 97, 107]，但如何进一步耦合这些过程，实现稳定的生长、分裂及后代功能维持，仍是长期挑战。微流控技术能够支持区室尺寸控制、动态成像与持续供料[45, 70, 71, 108, 109]，为解析物质供给、组分更新和区室运行状态之间的定量关系提供更灵活的实验手段。

蛋白质设计与数据驱动方法为应对人工细胞构建中的多变量优化问题提供了新的工具。已有研究讨论了蛋白质序列与结构设计在人工细胞中的应用前景[93]；Zhu等开发的DropAI将微流控液滴筛选、荧光编码与机器学习相结合，用于识别影响CFE产量的关键组分并优化反应配方[91]。这类方法不仅有助于提高筛选效率，也能够从复杂变量组合中识别值得进一步验证的影响因素。未来可将人工智能与机制模型、高通量实验及单区室定量表征相结合，形成“候选设计—实验验证—模型更新”的迭代优化流程，用于筛选蛋白序列、模板组合和反应条件。然而，模型预测的高表达量或高评分并不等同于封装体系中的功能成功，体外筛选结果也未必能够直接迁移至具有特定边界和传质条件的人工细胞。因此，优化目标应从单一荧光信号或总表达量，拓展至蛋白实际活性、区室间异质性、运行寿命及目标任务完成度，并通过独立实验检验预测结果的可靠性与适用范围。

总体而言，CFE技术的应用已由基础蛋白质表达拓展至遗传线路、蛋白质工程与人工细胞构建，为遗传程序与功能模块的进一步整合奠定了技术基础[110]。人工细胞研究也正由单一功能构建转向多过程协同设计：遗传程序决定功能组分的生成，区室边界调控组分保留与物质交换，资源供给和组分更新则共同决定功能维持的时间与稳定性。未来的关键不在于单纯增加模块数量或提高表达强度，而在于建立目标明确、资源协调、边界适配且可定量验证的系统设计框架，构建能够在规定条件下稳定、可预测地完成目标任务的人工细胞。这既是推动实际应用的基础，也将为探索自我维持与自主运行的必要条件提供实验依据[9, 99]。

参 考 文 献

[1] LUISI P L, FERRI F, STANO P. Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review [J]. Naturwissenschaften, 2006, 93(1): 1-13.

[2] BLAIN J C, SZOSTAK J W. Progress toward synthetic cells [J]. Annual Review of Biochemistry, 2014, 83: 615-640.

[3] SZOSTAK J W, BARTEL D P, LUISI P L. Synthesizing life [J]. Nature, 2001, 409(6818): 387-390.

[4] FORSTER A C, CHURCH G M. Towards synthesis of a minimal cell [J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2(1): MSB4100090.

[5] SCHWILLE P. Bottom-Up Synthetic Biology: Engineering in a tinkerer's world [J]. Science, 2011, 333(6047): 1252-1254.

[6] SCHWILLE P, SPATZ J, LANDFESTER K, et al. MaxSynBio: Avenues towards creating cells from the bottom up [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2018, 57(41): 13382-13392.

[7] ADAMALA K P, DOGTEROM M, ELANI Y, et al. Present and future of synthetic cell development [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2024, 25(3): 162-167.

[8] ROTHSCHILD L J, AVERESCH N J H, STRYCHALSKI E A, et al. Building synthetic cells — from the technology infrastructure to cellular entities [J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(4): 974-997.

[9] SAMANTA A, BARANDA PELLEJERO L, MASUKAWA M, et al. DNA-empowered synthetic cells as minimalistic life forms [J]. Nature Reviews Chemistry, 2024, 8(6): 454-470.

[10] GöPFRICH K, PLATZMAN I, SPATZ J P. Mastering Complexity: Towards bottom-up construction of multifunctional eukaryotic synthetic cells [J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(9): 938-951.

[11] SHIMIZU Y, INOUE A, TOMARI Y, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components[J]. Nature

Biotechnology, 2001, 19(8): 751-755.

[12] 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.

[13] HUNT A C, RASOR B J, SEKI K, et al. Cell-free gene expression: methods and applications[J]. Chemical Reviews, 2025, 125(1): 91-149.

[14] 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.

[15] CASCHERA F, NOIREAUX V. Integration of biological parts toward the synthesis of a minimal cell[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2014, 22: 85-91.

[16] NOIREAUX V, LIBCHABER A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(51): 17669-17674.

[17] NOIREAUX V, BAR-ZIV R, GODEFROY J, et al. Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles[J]. Physical Biology, 2005, 2(3): P1-P8.

[18] SHIN J, NOIREAUX V. An E. coli Cell-Free Expression Toolbox: Application to synthetic gene circuits and artificial cells [J]. ACS Synthetic Biology, 2012, 1(1): 29-41.

[19] NOIREAUX V, LIU A P. The new age of cell-free biology[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2020, 22: 51-77.

[20] ADAMALA K P, MARTIN-ALARCON D A, GUTHRIE-HONEA K R, et al. Engineering genetic circuit interactions within and between synthetic minimal cells[J]. Nature Chemistry, 2017, 9(5): 431-439.

[21] LENTINI R, SANTERO S P, CHIZZOLINI F, et al. Integrating artificial with natural cells to translate chemical messages that direct E. coli behaviour[J]. Nature Communications, 2014, 5(1): 4012.

[22] GARAMELLA J, MAJUMDER S, LIU A P, et al. An adaptive synthetic cell based on mechanosensing, biosensing, and inducible gene circuits[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(8): 1913-1920.

[23] LAVICKOVA B, LAOHAKUNAKORN N, MAERKL S J. A partially self-regenerating synthetic cell[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 6340.

[24] BERHANU S, UEDA T, KURUMA Y. Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1325.

[25] NOURIAN Z, ROELOFSEN W, DANELON C. Triggered gene expression in fed-vesicle microreactors with a multifunctional membrane[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51(13): 3114-3118.

[26] VAN NIES P, WESTERLAKEN I, BLANKEN D, et al. Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1583.

[27] TORRE P, KEATING C D, MANSY S S. Multiphase water-in-oil emulsion droplets for cell-free transcription-translation[J]. Langmuir, 2014, 30(20): 5695-5699.

[28] TANG T Y D, VAN SWAAY D, DEMELLO A, et al. In vitro gene expression within membrane-free coacervate protocells [J]. Chemical Communications, 2015, 51(57): 11429-11432.

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

[30] GARAMELLA J, MARSHALL R, RUSTAD M A, et al. The all E. coli TX-TL toolbox 2.0: a platform for cell-free synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(4): 344-355.

[31] SUN Z, HAYES C, 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, 2013, (79): e50762.

[32] CASCHERA F, NOIREAUX V. Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all Escherichia coli cell-free transcription-translation system[J]. Biochimie, 2014, 99: 162-168.

[33] LAVICKOVA B, MAERKL S J. A simple, robust, and low-cost method to produce the PURE cell-free system[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(2): 455-462.

[34] JACKSON K, KANAMORI T, UEDA T, et al. Protein synthesis yield increased 72 times in the cell-free PURE system [J]. Integrative Biology, 2014, 6(8): 781-788.

[35] JEWETT M C, SWARTZ J R. Substrate replenishment extends protein synthesis with an in vitro translation system designed to mimic the cytoplasm[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87(4): 465-471.

[36] CALHOUN K A, SWARTZ J R. Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 90(5): 606-613.

[37] KIM D-M, SWARTZ J R. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 66(3): 180-188.

[38] CASCHERA F, NOIREAUX V. A cost-effective polyphosphate-based metabolism fuels an all E. coli cell-free expression system [J]. Metabolic Engineering, 2015, 27: 29-37.

[39] OSAWA M, ANDERSON D E, ERICKSON H P. Curved FtsZ protofilaments generate bending forces on liposome membranes [J]. Embo j, 2009, 28(22): 3476-3484.

[40] NIEDERHOLTMEYER H, STEPANOVA V, MAERKL S J. Implementation of cell-free biological networks at steady state [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(40): 15985-15990.

[41] NIEDERHOLTMEYER H, SUN Z Z, HORI Y, et al. Rapid cell-free forward engineering of novel genetic ring oscillators [J]. eLife, 2015, 4: e09771.

[42] DOERR A, DE REUS E, VAN NIES P, et al. Modelling cell-free RNA and protein synthesis with minimal systems [J]. Physical Biology, 2019, 16(2): 025001.

[43] BORKOWSKI O, BRICIO C, MURGIANO M, et al. Cell-free prediction of protein expression costs for growing cells [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1457.

[44] BELLUATI A, JIMAJA S, CHADWICK R J, et al. Artificial cell synthesis using biocatalytic polymerization-induced self-assembly [J]. Nature Chemistry, 2024, 16(4): 564-574.

[45] IZRI Z, GARENNE D, NOIREAUX V, et al. Gene expression in on-chip membrane-bound artificial cells [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(8): 1705-1712.

[46] BUDDINGH B, HEST J. Artificial Cells: Synthetic compartments with life-like functionality and adaptivity [J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50.

[47] DZIECIOL A J, MANN S. Designs for life: protocell models in the laboratory [J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(1): 79-85.

[48] RIDEAU E, DIMOVA R, SCHWILLE P, et al. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking [J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(23): 8572-8610.

[49] MARTINO C, KIM S H, HORSFALL L, et al. Protein expression, aggregation, and triggered release from polymersomes as artificial cell-like structures[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51(26): 6416-6420.

[50] YEWDALL N A, MASON A F, VAN HEST J C M. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells[J]. Interface Focus, 2018, 8(5): 20180023.

[51] VILLAR G, GRAHAM A D, BAYLEY H. A tissue-like printed material [J]. Science, 2013, 340(6128): 48-52.

[52] OSAWA M, ANDERSON D E, ERICKSON H P. Reconstitution of contractile ftsz rings in liposomes [J]. Science, 2008, 320(5877): 792-794.

[53] DENG N-N, YELLESWARAPU M, HUCK W T S. Monodisperse uni- and multicompartment liposomes [J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(24): 7584-7591.

[54] DESHPANDE S, CASPI Y, MEIJERING A E C, et al. Octanol-assisted liposome assembly on chip [J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 10447.

[55] SUN Z Z, YEUNG E, HAYES C A, et al. Linear DNA for rapid prototyping of synthetic biological circuits in an escherichia coli based TX-TL cell-free system [J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(6): 387-397.

[56] SCHINN S-M, BROADBENT A, BRADLEY W T, et al. Protein synthesis directly from PCR: progress and applications of cell-free protein synthesis with linear DNA [J]. New Biotechnology, 2016, 33(4): 480-487.

[57] GONZALES D T, YANDRAPALLI N, ROBINSON T, et al. Cell-Free gene expression dynamics in synthetic cell populations [J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(1): 205-215.

[58] GARENNE D, LIBCHABER A, NOIREAUX V. Membrane molecular crowding enhances MreB polymerization to shape synthetic cells from spheres to rods[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(4): 1902-1909.

[59] KURUMA Y, UEDA T. The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins[J]. Nature Protocols, 2015, 10 (9): 1328-1344.

[60] 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 [J]. Life, 2018, 8(4): 54.

[61] HINDLEY J W, ZHELEVA D G, ELANI Y, et al. Building a synthetic mechanosensitive signaling pathway in compartmentalized artificial cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(34): 16711-16716.

[62] HARJUNG A, FRACASSI A, DEVARAJ N K. Encoding extracellular modification of artificial cell membranes using engineered self-translocating proteins [J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 9363.

[63] XIE K, DALBEY R E. Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases [J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(3): 234-244.

[64] DALBEY R E, WANG P, KUHN A. Assembly of bacterial inner membrane proteins [J]. Annual Review of Biochemistry, 2011, 80(Volume 80, 2011): 161-187.

[65] DENKS K, VOGT A, SACHELARU I, et al. The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes [J]. Molecular Membrane Biology, 2014, 31(2-3): 58-84.

[66] KUHN A, KOCH H-G, DALBEY R E. Targeting and insertion of membrane proteins [J]. EcoSal Plus, 2017, 7(2): 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2016.

[67] KARIM A S, JEWETT M C. A cell-free framework for rapid biosynthetic pathway prototyping and enzyme discovery [J]. Metabolic Engineering, 2016, 36: 116-126.

[68] JIANG L, ZHAO J, LIAN J, 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.

[69] KARIM A S, DUDLEY Q M, JUMINAGA A, et al. In vitro prototyping and rapid optimization of biosynthetic enzymes for cell design [J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16(8): 912-919.

[70] BARANWAL A K, MAERKL S J. A comprehensive review of microfluidic approaches in cell-free synthetic biology[J]. Frontiers in Synthetic Biology, 2024, 2: 1397533.

[71] AYOUBI-JOSHAGHANI M H, DIANAT-MOGHADAM H, SEIDI K, et al. Cell-free protein synthesis: the transition from

batch reactions to minimal cells and microfluidic devices[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(4): 1204-1229.

[72] CALHOUN K A, SWARTZ J R. Energy systems for ATP regeneration in cell-free protein synthesis reactions[M]// GRANDI G. In vitro transcription and translation protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2007: 3-17.

[73] KIM H C, KIM D M. Methods for energizing cell-free protein synthesis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(1): 1-4.

[74] PATIÑO-RUIZ M F, ANSHARI Z R, GAASTRA B, et al. Chemiosmotic nutrient transport in synthetic cells powered by electrogenic antiport coupled to decarboxylation[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 7976.

[75] ROBINSON A O, LEE J, CAMERON A, et al. Cell-free expressed membraneless organelles inhibit translation in synthetic cells[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2024, 10(2): 773-781.

[76] FAN D, LIANG K, WU B, et al. Artificial cells with liquid-liquid phase separation-regulated cell-free protein synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2025, 122 (47): e2511283122.

[77] NOVOSEDLIK S, REICHEL F, VAN VELDHUISEN T, et al. Cytoskeleton-functionalized synthetic cells with life-like mechanical features and regulated membrane dynamicity[J]. Nature Chemistry, 2025, 17(3): 356-364.

[78] ZHU T F, SZOSTAK J W. Coupled growth and division of model protocell membranes [J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(15): 5705-5713.

[79] JI P, HARJUNG A, KNITTEL C H, et al. Photochemical synthesis of natural lipids in artificial and living cells[J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 5068.

[80] KARZBRUN E, TAYAR A M, NOIREAUX V, et al. Programmable on-chip DNA compartments as artificial cells [J]. Science, 2014, 345(6198): 829-832..

[81] TAYAR A M, KARZBRUN E, NOIREAUX V, et al. Propagating gene expression fronts in a one-dimensional coupled system of artificial cells[J]. Nature Physics, 2015, 11 (12): 1037-1041.

[82] DUPIN A, SIMMEL F C. Signalling and differentiation in emulsion-based multi-compartmentalized in vitro gene circuits [J]. Nature Chemistry, 2019, 11(1): 32-39.

[83] LENTINI R, MARTÍN N Y, FORLIN M, et al. Two-way chemical communication between artificial and natural cells[J]. ACS Central Science, 2017, 3(2): 117-123..

[84] MONCK C, ELANI Y, CERONI F. Genetically programmed synthetic cells for thermo-responsive protein synthesis and cargo release[J]. Nature Chemical Biology, 2024, 20(10): 1380-1386.

[85] BOOTH M J, SCHILD V R, GRAHAM A D, et al. Light-activated communication in synthetic tissues[J]. Science Advances, 2016, 2(4): e1600056.

[86] WANG Z, ZHANG M, ZHOU Y, et al. Coacervate microdroplets as synthetic protocells for cell mimicking and signaling communications [J]. Small Methods, 2023, 7(12): 2300042.

[87] 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.

[88] PARDEE K, SLOMOVIC S, NGUYEN P Q, et al. Portable, on-demand biomolecular manufacturing [J]. Cell, 2016, 167 (1): 248-259.e212.

[89] TAKAHASHI M K, TAN X, DY A J, et al. A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3347.

[90] JUNG J K, ALAM K K, VEROSLOFF M S, et al. Cell-free biosensors for rapid detection of water contaminants [J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(12): 1451-1459.

[91] ZHU J, MENG Y, GAO W, et al. AI-driven high-throughput droplet screening of cell-free gene expression[J]. Nature Communications, 2025, 16: 2720.

[92] AQUINO A K, MANZER Z A, DANIEL S, et al. Glycosylation-on-a-chip: a flow-based microfluidic system for cell-free glycoprotein biosynthesis[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 782905.

[93] FROHN B P, KOHYAMA S, SCHWILLE P. Protein design and optimization for synthetic cells[J]. Nature Reviews Bioengineering, 2025, 3(8): 645-659.

[94] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.

[95] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448.

[96] CHALMEAU J, MONINA N, SHIN J, et al. α-hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2011, 1808(1): 271-278.

[97] KURIHARA K, TAMURA M, SHOHDA K I, et al. Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA[J]. Nature Chemistry, 2011, 3(10): 775-781.

[98] MOGHIMIANAVVAL H, NEWELL C, PARVIZIAN P, et al. Strategies and applications of synthetic cell communication[J]. Nature Chemical Biology, 2025, 21: 1317-1329.

[99] TANG T Y D, CECCHI D, FRACASSO G, et al. Gene-mediated chemical communication in synthetic protocell communities[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(2): 339-346.

[100] FLETCHER M, DIGGINES B, ELANI Y. Molecular systems engineering of synthetic cells[J]. Nature Chemistry, 2026, 18 (1): 14-22.

[101] 陈琛, 田雪, 王卫军, 等. 无细胞蛋白质合成及其在智能生物制造中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2026, 46(8): 72-84.
CHEN C, TIAN X, WANG W J, et al. Cell-free protein synthesis and its applications in intelligent biomanufacturing[J]. China Biotechnology, 2026, 46(8): 72-84.

[102] 刘晚秋, 季向阳, 许慧玲, 等. 限制性内切酶的无细胞快速制备研究[J]. 合成生物学, 2023, 4(4): 840-851.
LIU W Q, JI X Y, XU H L, et al. Cell-free protein synthesis system enables rapid and efficient biosynthesis of restriction endonucleases[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(4): 840-851.

[103] OHTA N, KATO Y, WATANABE H, et al. In vitro membrane protein synthesis inside Sec translocon-reconstituted cell-sized liposomes[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36466.

[104] STEINKÜHLER J, PERUZZI J A, KRÜGER A, et al. Improving cell-free expression of model membrane proteins by tuning ribosome cotranslational membrane association and nascent chain aggregation[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13 (1): 129-140

[105] 唐宇琦, 叶松涛, 刘嘉, 等. 分子伴侣作用下的蛋白质稳定与进化[J]. 合成生物学, 2022, 3(3): 445-464.
TANG Y Q, YE S T, LIU J, et al. Molecular chaperones promote protein stability and evolution[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(3): 445-464.

[106] MOTTAGHI S S, MAERKL S J. PURE makes PURE: reconstitution of the PURE cell-free system from self-synthesized proteins[J]. Nature Communications, 2026, 17: 6756.

[107] RESTREPO SIERRA A M, RAMIREZ GOMEZ F, VAN TONGEREN M, et al. A synthetic cell with integrated DNA self-replication and lipid biosynthesis[J]. Nature Communications, 2026, 17: 2727.

[108] SHIROKOV V A, SIMONENKO P N, BIRYUKOV S V, et al. Continuous-flow and continuous-exchange cell-free translation systems and reactors[M]//SPIRIN A S. Cell-free translation systems. Berlin, Heidelberg: Springer, 2002: 91-107.

[109] BARANWAL A K, MAERKL S J. Microfluidics meets cell-free systems: from molecular engineering to synthetic cells[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2025, 96: 103384.

[110] 后佳琦, 姜楠, 马莲菊, 等. 无细胞蛋白质合成:从基础研究到工程应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(3): 465-486.
HOU J Q, JIANG N, MA L J, et al. Cell-free protein synthesis: from basic research to engineering applications[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(3): 465-486.



通讯作者： 李健（1982—），男，博士，研究员，博士生导师，研究方向为无细胞合成生物学。
E-mail：lijian@shanghaitech.edu.cn



第一作者： 黄芳情（2003—），女，硕士研究生，研究方向为人工细胞构建及应用。
E-mail：huangfq2025@shanghaitech.edu.cn

作者贡献声明：

黄芳情：文献调研与整理，撰写论文初稿，绘制图表；刘晚秋：参与论文框架讨论，参与论文修订；李健：选题指导，获取基金，参与论文修订和最终版本定稿。

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

利益冲突：

作者李健是本刊编委，在同行评议过程中未进行影响公平性的行为。其他作者没有利益冲突。