特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-089

# 基于蛋白质液-液相分离的人工细胞构筑

王运亭，高宁
（北京理工大学化学与化工学院，北京 100048）

**摘要：**细胞内广泛存在由蛋白质液-液相分离（Liquid-liquid phase separation， LLPS）形成的凝聚体，在细胞信号转导、应激响应等生理过程中发挥关键作用。受此启发，研究者致力于在细胞外利用蛋白质LLPS构建人工细胞，以期复制并拓展此类区室化功能。本文系统综述了蛋白质发生LLPS的分子基础与构筑方法，并梳理了基于LLPS区室结构构建人工细胞的关键组件及其应用前沿。首先，概述LLPS的基本原理、多价分子组装的内在机制，以及由蛋白质LLPS驱动的凝聚体结构特征与生物学功能。其次，从数据库检索、生物信息学预测、蛋白质LLPS构筑方法到结构表征鉴定，系统梳理了诱导目标蛋白实现LLPS的设计思路。在此基础上，从能量供应与代谢、遗传信息处理与传递、膜-凝聚体耦合作用、选择性物质交换和环境响应性等组成模块角度，归纳从LLPS到人工细胞的构建思路。随后，概述了基于蛋白质LLPS构筑的人工细胞在微型反应器、生物传感器、靶向治疗、药物递送等领域的应用进展。最后，展望未来，蛋白质LLPS领域需要继续在持续供能、功能寿命与区室串扰等方面不断突破，推动人工细胞从静态模拟迈向非平衡态自主运行，为构建具有类生命行为的人工细胞奠定关键基础。

**关键词：**液-液相分离；蛋白质修饰；人工细胞；无膜细胞器；凝聚体

**中图分类号：**Q71　　**文献标志码：**A

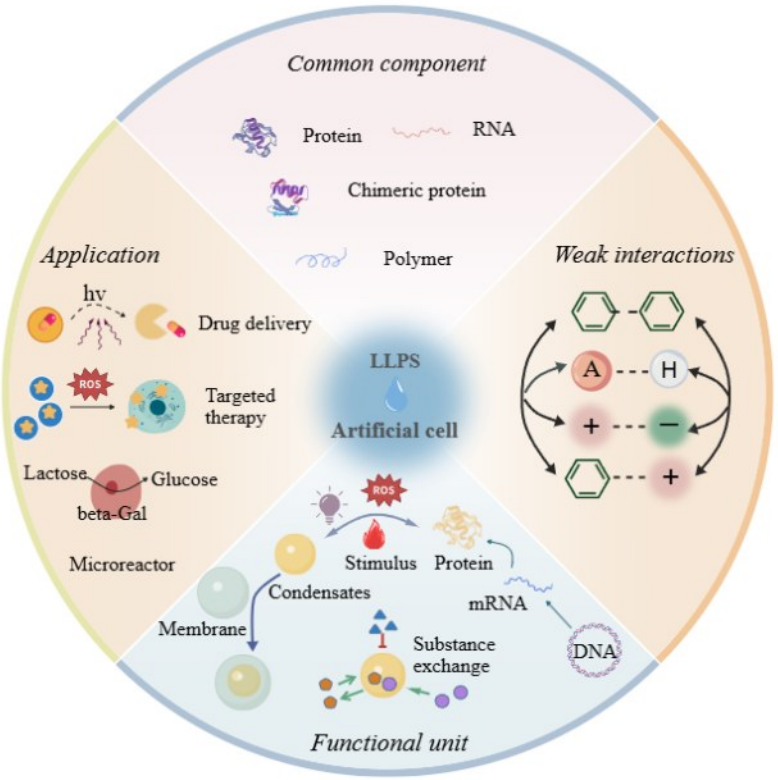
# Protocell construction based on liquid-liquid phase separation of proteins

WANG Yunting，GAO Ning
（*School of Chemistry and Chemical Engineering*， *Beijing Institute of Technology*， *Beijing 100048*， *China*）

**Abstract:** Intracellular condensates formed by protein liquid-liquid phase separation (LLPS) are widespread. This achieves spatial compartmentalization and forms the basis of membraneless organelles. Compared with liposomes and polymer vesicles, LLPS compartments offer programmable composition, dynamic reversibility, and selective enrichment without a membrane. Inspired by this, researchers are building artificial cells using protein LLPS outside living systems. However, natural LLPS is embedded in dynamically reversible cellular regulatory networks. Therefore, it cannot be directly transplanted as an engineering module. Still, its spatiotemporal regulatory mechanisms provide an

收稿日期：2026-08-28 修回日期：2026-11-11
基金项目：国家自然科学基金（22572009，22302009）；中央高校基本科研业务费专项资金资助
引用本文：王运亭，高宁. 基于蛋白质液-液相分离的人工细胞构筑[J]. 合成生物学，2026，7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-089
Citation：WANG Yunting，GAO Ning. Protocell construction based on liquid-liquid phase separation of proteins[J]. Synthetic Biology Journal，2026，7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-089

entry point for artificial control. By mimicking or controlling post-translational modifications and the local microenvironment, LLPS dynamics can be reproduced in simplified systems. This avoids the interference caused by site heterogeneity and signal coupling, enabling causal analysis and active control of LLPS behavior. This review summarizes the molecular basis and construction methods of protein LLPS. It also covers the key components and application frontiers of artificial cells built on LLPS. First, the basic principles of LLPS, the mechanisms of multivalent molecular assembly, and the structural and functional features of condensates are outlined. Second, design strategies for inducing LLPS in target proteins are reviewed. These include database mining, bioinformatic prediction, construction methods, and structural characterization. LLPS compartments already show a prototype of artificial cells. However, to realize life-like artificial cells, key modules must be summarized. These include energy supply and metabolism, genetic information processing and transmission, membrane – condensate coupling, selective material exchange, and environmental responsiveness. Subsequently, the application progress of LLPS-based artificial cells is outlined. This covers microreactors, biosensors, targeted therapy, and drug delivery. Technical challenges such as continuous energy supply, functional lifespan, and compar-tment crosstalk are discussed. Future solutions are also proposed. Addressing these issues will help drive artificial cells from static simulation toward non-equilibrium autonomous operation. It will also enable the transition from assembly to operation, from single function to programmable, and from passive response to autonomous regulation. This lays a key foundation for constructing life-like artificial cells.




**Keywords:** liquid-liquid phase separation; protein modification; artificial cell; membrane-less organelle; condensates

细胞内广泛存在由蛋白质液-液相分离（Liquid-liquid phase separation， LLPS）形成的无膜凝聚体。LLPS 使特定蛋白质与核酸在无脂膜包被的条件下富集于独立的液相微区，实现空间区

室化，是应激颗粒、核仁、P小体等无膜细胞器的物理化学基础。相比脂质体、聚合物囊泡等传统区室结构，LLPS区室具有组分可编程、动态可逆、无需膜结构即可实现选择性富集等独特优势。天然LLPS并非持续激活的静态结构，而是嵌入动态可逆的调控网络之中，仅在特定时空条件下响应内外信号，启动凝聚体的可逆组装与解聚。这种"按需触发"的特性，意味着天然LLPS的调控依赖细胞自身的调控网络，无法直接作为工程模块移植使用

然而，这并不意味着天然LLPS的分子机制不可借鉴。恰恰相反，天然系统实现时空调控的分子机制，为人工控制相分离提供了可操作的切入点。在体内，蛋白LLPS受到翻译后修饰与局部微环境的协同调控。

蛋白质翻译后修饰通过共价添加或移除化学基团，重塑电荷分布与疏水特性，微调驱动LLPS的弱多价相互作用。而pH、离子强度、拥挤程度等局部微环境则从物理层面调控相分离的热力学驱动力。通过模拟或人为控制修饰状态与微环境，便能在简化系统中复现LLPS的动态过程，规避天然调控网络中位点异质性与信号耦合带来的干扰，实现对LLPS行为的因果解析与主动控制。LLPS的区室化结构虽已具备人工细胞雏形，但要实现具有生命样行为的人工细胞，仍需能量供应与代谢、生长、分裂与复制、通讯以及适应性等特征，才能将其整合为一个功能完整的人工细胞系统[1]。如赋予能量供应与代谢模块后，人工细胞能够从外部摄取物质与能量，驱动内部生化反应，维持非平衡态[2]。目前，人工细胞构筑领域仍处于模块化构建与单功能验证阶段，各功能模块的独立演示已取得进展，但系统性集成仍是核心挑战。

本文围绕以蛋白质LLPS模块为基础构筑具有应用价值的人工细胞这一议题展开讨论。首先介绍LLPS的物理化学基础与天然原型，进而聚焦蛋白LLPS的构筑策略，梳理从序列预测、相分离诱导到无细胞表达与结构表征的设计路径。随后归纳出能量供应与代谢、遗传信息处理与传递、膜-凝聚体耦合、选择性物质交换及环境响应性等人工细胞组成的核心模块。在此基础上评述人工细胞在区室化催化、生物传感与功能化部署方面的应用进展，并讨论持续供能、功能寿命、区室串扰等技术挑战，进而提出未来的解决方向。

## 1 液-液相分离概述

### 1.1 LLPS的发展历程

如图1所示，LLPS的认知经历了从物理化学现象到生命科学核心机制的百年演进。早在1896年，Beijerinck即观察到高分子水溶液可自发分层形成“双水相体系”[3]。1936年，Oparin进一步提出有机分子自发聚集形成的"凝聚体"可浓缩反应物、模拟细胞微环境，构建了最早的"原始细胞"模型。然而此后近一个世纪，LLPS研究主要局限于材料与化学领域。直至2009年，Brangwynne等人发现秀丽隐杆线虫P颗粒具有融合、分裂、流动等典型液态行为，才将LLPS正式引入细胞生物学前沿[4]。2012年，Rose团队揭示多价弱相互作用形成动态网络是LLPS的关键分子机制，为理性设计奠定了基础。此后的研究不断证实，LLPS形成的无膜区室广泛参与基因表达调控、信号转导与应激响应等过程。

### 1.2 LLPS的分子驱动机制

经过长期研究，LLPS的本质逐渐被揭示，它并非简单的聚集或沉淀，而是生物大分子在均相溶液中达到临界浓度后，通过弱多价相互作用自发形成高分子浓相液滴，与周围稀相共存的物理化学现象[5]。从分子层面看，驱动相分离的核心是多价相互作用网络的形成，重复结构域、固有无序区域与核酸/聚电解质分别代表了三种不同逻辑的多价组装策略。其中，重复结构域与固有无序区域同属蛋白质内在的多价模块。重复结构域通过线性串联或寡聚化整合多个结合模块，赋予分子明确价态和可预测的相互作用界面，使体系越过临界浓度自发形成浓相液滴。如polySH3-polyPRM体系可通过改变重复单元数目调节价态，进而调控相分离临界浓度[6]。固有无序区域则依靠多类残基间的弱相互作用，提供更多价、更灵活的组装方式。其价态难以精确计数，界面更具动态性和异质性，因而对序列保守性要求更低，

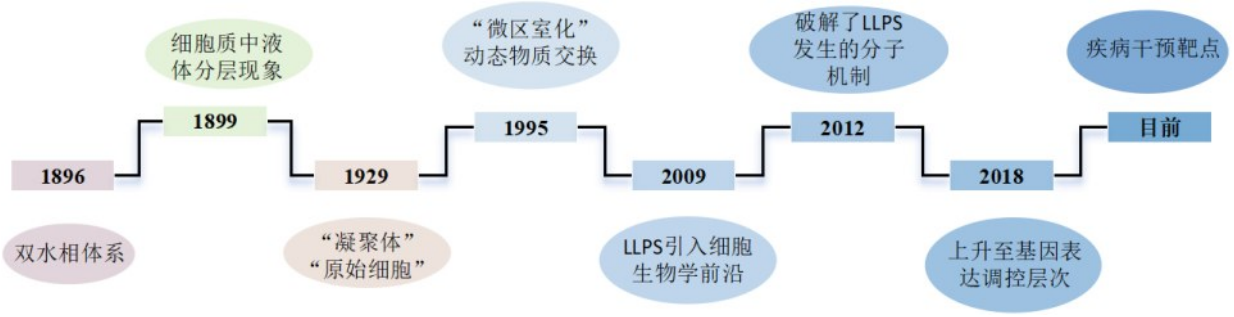



**图1** LLPS由物理化学现象逐步演进为生命科学核心机制的发展历程

**Fig. 1** The developmental history of LLPS as it evolved from a physicochemical phenomenon into a core mechanism in the life sciences

也更易受磷酸化等翻译后修饰调控。例如，磷酸化可抑制FUS固有无序区的相分离，抑制程度与磷酸化位点数目相关。而在全长FUS中，磷酸化并不阻断初始相分离，而是抑制液滴向毒性聚集体转化，这表明同一修饰在不同序列背景下可产生截然不同的调控效果[7]。二者共同构成蛋白质相分离的序列内在驱动力，但在价态明确性与调控灵活性上存在明显差异。

核酸与聚电解质介导的LLPS则代表另一类以静电作用为主导的驱动机制。RNA负电磷酸骨架与蛋白质精氨酸/赖氨酸残基的静电吸引作用，以及RNA碱基与芳香残基的堆积作用是关键驱动力。单链核酸的柔性骨架可同时结合多个蛋白质分子，形成动态可逆的三维网络。例如，表面净电荷从+12到+36的超级阳离子GFP变体可与内源RNA发生复合凝聚，且随正电荷增加，相分离倾向增强[8]。该人工体系直接证明仅靠静电吸引力，无需特定序列或结构域，就能发生LLPS。此外，蛋白质还可与离子多糖[9, 10]、聚电解质[11]通过静电作用等形成复合凝聚体，这类体系的工程优势在于聚电解质种类丰富、电荷密度与链长可调，为人工细胞凝聚体提供了独立于蛋白质序列的设计变量。蛋白质相分离的分子机制为合成生物学提供了可编程的组装工具。通过理性设计重复结构域的价态、固有无序区的相互作用模式，或引入核酸与聚电解质作为多价支架，可构建具有特定阈值与材料性质的人工凝聚体。

### 1.3 蛋白质LLPS：从无膜细胞器到人工细胞

生物体内蛋白质间或蛋白-RNA间发生LLPS，形成的动态区室化结构，属于天然生物凝聚体（Biomolecular condensates），本质上是细胞内一类容易被忽视的“无膜细胞器”。与线粒体、内质网、高尔基体等经典有膜细胞器不同，无膜细胞器没有脂质双分子层包被，依赖弱多价相互作用自发形成。其边界具有动态渗透性，允许内部组分与周围细胞质基质在秒至分钟尺度上发生快速交换。核仁、卡哈尔体、应激颗粒、P-小体以及多种信号凝聚体均属此类。该类无膜细胞器的核心功能优势包括三个方面：第一，选择性富集。凝聚体通过LLPS机制，选择性地富集特定的蛋白质、RNA及小分子，同时排除其他物质，从而在无膜条件下形成独特的化学微环境，实现代谢调控、信号转导及RNA加工等复杂生化过程[12]。第二，动态可逆性。其快速融合、分裂以及与周围环境的组分交换能力，使凝聚体能够实时响应细胞内环境变化；在应激条件下完成可逆组装与解离，从而实现功能上的灵活切换。第三，亚区室化组织。凝聚体可通过多相分离形成内部功能亚区，实现复杂生化反应的时空有序编排。以核仁为例，三个逐层嵌套的亚区分别对应rDNA转录、rRNA前体加工及核糖体蛋白组装。这种多级亚区结构在同一凝聚体内构建逐级反应序列，既避免了中间产物扩散稀释，又实现了反应次序的精确控制，显著提升了多步生物过程的效率。这些无膜细胞器的独特优势为合成生物学提供了可编程的功能模块，使其从生物物理现象升级为人工细胞构筑的重要工具。

本综述所讨论的人工细胞范围涵盖三个层次：1）具有细胞样行为的蛋白质凝聚体，作为人工细

胞的简化模型；2）蛋白质凝聚体作为功能细胞器构建的人工细胞；3）将人工细胞器植入活细胞所形成的混合细胞体系。在第一层次中，单纯由蛋白质或肽段通过液-液相分离形成的凝聚体，可模拟原始细胞的选择性富集分子、催化反应、响应环境信号等基本行为，被视为探索细胞功能的简化平台[13]。如基于PodJIDR工程蛋白凝聚体，研究者成功构建了高效的级联催化系统。该平台借助空间分离策略实现酶的精准招募，优化整体催化性能[14]。除酶促反应外，研究者构建的RLP蛋白凝聚体借助其界面电场及内部化学微环境，还能够非酶促地催化氧化还原反应与水解反应[15，16]。第二层次将凝聚体作为无膜细胞器嵌入人工构建的膜区室中，赋予人工细胞特定的生化功能。如研究者基于RGG蛋白LLPS在葡聚糖液滴内形成核-质分区结构，其中内部液滴富集DNA模板与RNA聚合酶以执行转录，mRNA则可自由迁移至外部液滴进行翻译，由此实现无膜分隔的转录-翻译时空偶联。在此基础上，研究者改造细菌微区室壳蛋白，使其在液滴界面自组装为蛋白质外壳，构建了兼具功能性与结构稳定性的人工细胞[17]。第三层次则把预制或原位合成的人工细胞器引入活细胞，在天然细胞环境中添加或恢复特定功能。如人工金属酶被封装于相分离区室化的细菌体内，经聚合物修饰后进入真核细胞，在活细胞和动物模型中通过前药激活实现癌症治疗[18]。上述人工细胞均通过设计蛋白凝聚体的类细胞性质，在不同复杂度层级上模拟、替代或增强天然细胞功能，为合成生物学与生物医学工程提供了从基础机制探索到应用转化的系统性平台。

## 2 以蛋白质LLPS构建人工细胞简化模型

为了确定目标蛋白是否发生LLPS及其发生的条件，研究者可通过PhaSepDB、LLPSDB等专用数据库检索目标蛋白的已知LLPS信息，以获取直接的实验依据。若数据库中未查询到相关信息，利用Phaseek、FuzDrop等生物信息学工具对蛋白序列进行系统分析，精准预测其内在无序区及LLPS关键驱动氨基酸，并可结合遗传算法与深度学习模型对序列进行定向改造，从而实现对LLPS倾向的增强或抑制。在确认目标蛋白自身缺乏LLPS能力后，可通过蛋白翻译后修饰、小分子诱导或基因工程手段对蛋白进行改造，并在体外特定条件下促进其发生LLPS。最后，通过评估其液态流动性，并辅以荧光颗粒追踪等方法，对凝聚体的物理属性进行系统鉴定，从而全面验证目标蛋白的LLPS行为。目标蛋白LLPS的具体设计思路如图2所示。

### 2.1 蛋白LLPS数据库与相分离预测工具

近年来，研究人员已开发了多个面向不同研究需求的LLPS相关数据库，这些资源从LLPS蛋白的鉴定、修饰注释、驱动区域预测等不同层面，为蛋白质LLPS领域内的信息检索与功能挖掘提供了系统性的数据平台。根据构成凝聚体支架蛋白质来源，查询对应的数据库，获取LLPS信息（表1）。如BAV-LLPS库和PhaSePro库主要覆盖真核、细菌及病毒来源的蛋白[20] [21]，而DrLLPS库则收录真核生物蛋白质的LLPS信息[22]。不同数据库收录的相分离信息不同。如LLPSDB库专注于体外实验体系，详细记录了蛋白浓度、pH、温度、离子强度等LLPS条件，为体外重构条件的优化提供了系统的数据支撑。PhaSepDB库专注于体内外实验验证的相分离蛋白体系，详细记录了蛋白的物质状态（液态或胶固态）、相分离验证实验类型、实验所用蛋白片段、不同条件下的相图以及共相分离伙伴和调控信息。其核心特色在于区分“PS-self”（蛋白可独自发生相分离）和“PS-other”（需伙伴分子参与），并对每个蛋白提供残基水平的序列特征注释，整合了内在无序区预测、朊病毒样序列预测、电荷与疏水性分布以及磷酸化等翻译后修饰位点[23]。此外，CD-CODE库与综合LLPS数据集这些综合性数据资源，兼顾不同物种来源的蛋白注释，共同支撑LLPS计算预测模型的构建与评估[24]。

除了数据库，研究者还开发出多种基于蛋白质序列的计算工具以预测LLPS倾向性。这些工具在算法原理、特征选择和应用场景上各有侧重，

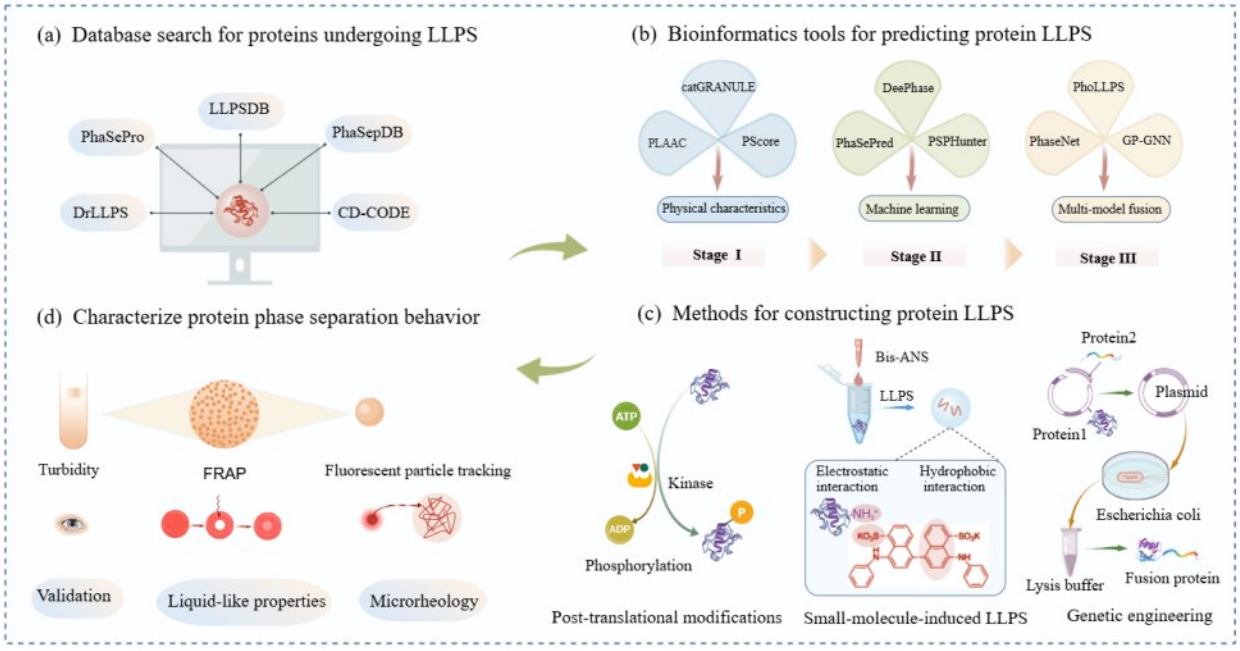



**图2** 目标蛋白LLPS的设计思路：（a）检索蛋白LLPS的数据库，（b）预测蛋白LLPS的工具，（c）构筑蛋白质凝聚体的方法，（d）鉴定蛋白凝聚体的常用表征技术（使用BioGDP.com绘制[19]）

**Fig. 2** Design Strategies for Inducing LLPS of Target Proteins: (a) the databases for searching protein LLPS, (b) the tools for predicting protein LLPS, (c) the methods for constructing protein condensates, (d) commonly characterization techniques for identifying protein condensates (Created with BioGDP.com[19])

**表1** 不同蛋白质相分离数据库中支架蛋白来源、核心数据内容与功能注释信息汇总表

**Table 1** Summary of scaffold protein sources, core data content, and functional annotations in different protein phase separation databases.

| 数据库 | 支架蛋白来源 | 核心数据 | 独特功能与注释 |
|---|---|---|---|
| LLPSDB | 天然蛋白，人工设计蛋白 | 实验或文献验证的LLPS蛋白：586个 | LLPS的实验条件（温度、pH等）；200多个相图 |
| PhaSePro | 真核，细菌，病毒 | 实验或文献验证的LLPS蛋白：121个 | 关键蛋白区域；分子作用力类型；标准化注释；蛋白翻译后修饰、功能、疾病等信息 |
| BAV-LLPS | 细菌，古菌，病毒 | 实验或文献验证的LLPS蛋白：94个，预测的LLPS蛋白：>5000个 | 填补原核和病毒LLPS空白；整合序列特征、无序区预测、LLPS概率 |
| DrLLPS | 真核生物 | 实验或文献验证的LLPS蛋白：150个，预测的LLPS蛋白：7793个 | 整合110个外部资源和16个维度注释，适用于大规模筛选与进化分析 |
| PhaSepDB | 模式生物 | 实验或文献验证的LLPS蛋白：1,849个 | 序列与结构特征分析；蛋白质物质状态；相关突变与疾病；免疫荧光图像。 |
| CD-CODE | 综合性 | LLPSDB，DrLLPS，PhaSepDB，PhaSePro数据库，新增224个文献验证蛋白 | 凝聚体组分与蛋白角色定位；功能信息与相关疾病；调控药物信息 |
| 综合LLPS数据集 | 综合性 | 整合所有相关LLPS数据库信息 | 系统性整合与标准化重分类；构建标准化“负数据集”；基准测试；数据开放与附加分析 |

按其发展脉络大致可划分为三代：第一代基于特定生物物理特征的统计模型，第二代基于机器学习的预测器，以及最新一代基于蛋白质语言模型的方法。自2014年以来，蛋白质LLPS预测工具的发展清晰地呈现出一条从序列特征驱动向多维生物物理信息融合，再向高精度结构与功能解析演进的脉络。早期以2014年的PLAAC和2016年的catGRANULE为代表，主要基于氨基酸组成、无序倾向等单一或少数序列特征进行预测[24, 25]。2018至2021年间，工具开始引入机器学习算法，

如基于π-π相互作用的PScore、随机森林分类器PSAP，以及整合序列与结构特征的ParSe和DeePhase，预测能力与泛化性显著提升[26-28]。该阶段的技术核心主要依赖少数确定的序列特征或生物物理属性（如特定氨基酸丰度、无序区预测），模型相对简单，但预测的覆盖面较窄，且不同工具之间的结果一致性较差。2022年迎来了集中爆发期，PhaSePred、PSPredictor和LLPhyScore等一批综合预测器涌现，通过整合多种理化特征与机器学习模型，实现了更全面的性能优化[29, 30]。该时期多源特征整合成为主流，模型开始融合序列组成、无序性、理化性质、翻译后修饰位点甚至免疫荧光图像等多模态特征。机器学习模型和深度学习模型被广泛应用。自2023年起，领域重心从开发通用型工具转向了解决特定生物学问题和提升预测分辨率，典型代表如PSPHunter和catGRANULE 2.0利用AlphaFold结构信息实现了单氨基酸水平的突变效应预测，PhosLLPS则基于图神经网络专门预测调控LLPS的磷酸化位点，而PhaseNet更进一步将预测细分为自组装型和伴侣依赖型。预测不再依赖单一序列，而是将序列、结构、相互作用网络等多种信息模态，通过图神经网络、注意力机制等复杂架构进行融合学习。这不仅提升了预测准确性，更重要的是，模型开始具备可解释性，能够指出是序列中驱动LLPS的区域甚至具体氨基酸残基。这一演进过程反映了领域从LLPS预测的定性问题，逐步深入到调控机制性探索，方法论的成熟度与生物学问题的复杂性同步提升。

## 2.2　蛋白质LLPS的构筑

根据作用方式与实现路径的不同，蛋白质LLPS的构筑方法大致可分为三类：蛋白翻译后修饰、小分子诱导法和基因工程技术（图3）。三者均通过影响蛋白质间的相互作用来调控LLPS，但作用位点与方式、反应可逆性、适用范围呈现显著差异，相互补充，共同构成了从快速干预到长期编程的多层次工具体系。

### 2.2.1　蛋白翻译后修饰

酶催化修饰法与化学修饰法都是实现蛋白质翻译后修饰或体外修饰的重要手段，二者各有特点。化学修饰法操作简便、成本可控，适于规模化体外修饰，其原理在于利用蛋白质侧链残基（如氨基、羧基、羟基、巯基等）与化学基团或生物相容性大分子形成共价连接，从而改善蛋白稳定性或延长半衰期。然而，该方法因修饰剂的非特异性，通常会产生异质产物，且修饰位点不可控，存在干扰蛋白活性中心构象的风险。目前，化学修饰诱导LLPS策略主要局限于短肽（如二

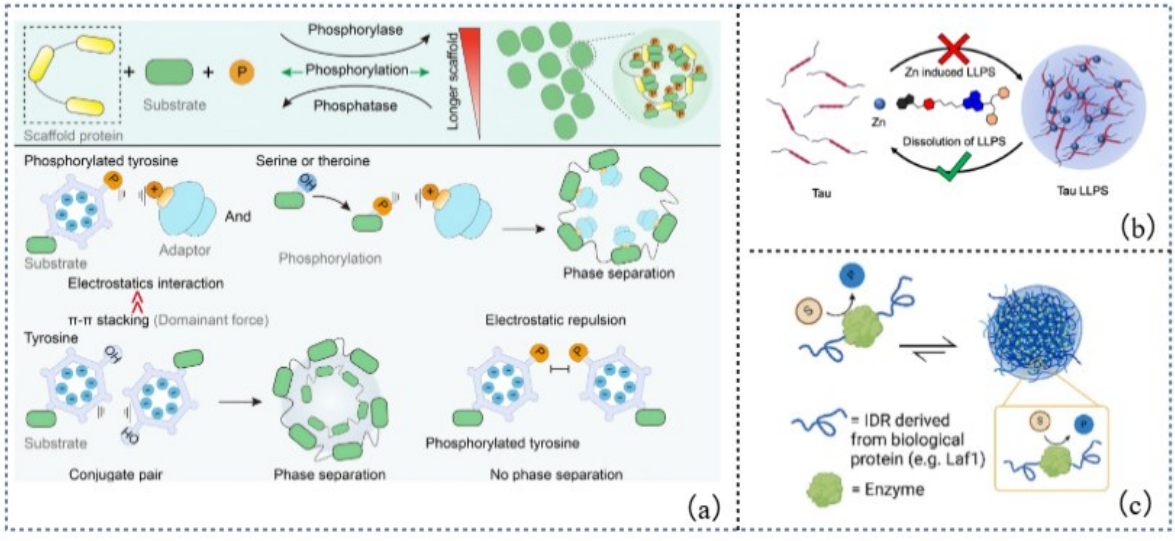



**图3**　蛋白LLPS的构筑方法：（a）蛋白翻译后修饰[36]，（b）小分子诱导法[45]，（c）基因工程法[46]

**Fig. 3**　Construction methods for protein LLPS: (a) protein post-translational modification [36], (b) small-molecule induction[45], (c) genetic engineering [46]

肽[31, 32]、四肽[33]），在蛋白质LLPS体系中的报道较少。这与化学修饰过程中蛋白质易失活变性的密切相关。因此，蛋白质修饰效果的关键在于开发温和高效的化学工具，精准把握蛋白稳定性的边界。近期，研究者通过化学接枝成功向亲水性明胶中引入疏水性萘基团，所得两亲性蛋白修饰物在生理条件下即可触发LLPS[34]。相比化学修饰产物的异质性，酶催化修饰法凭借酶固有的底物专一性，可实现蛋白质的定点、定量修饰，大幅提高产物的均一性。同时，酶法可以实现细胞内翻译后修饰，并调节蛋白质LLPS的动态变化。但其调控效果高度依赖特定蛋白质的序列分布、修饰位点位置及周围化学环境，具有明显的体系依赖性。此外，在实际应用中面临酶制剂成本高、稳定性差、操作复杂及难以规模化等局限。目前，诱导蛋白质发生LLPS的调控手段以酶催化修饰为主，其中磷酸化对蛋白LLPS的调控具有双向性，既可通过增加负电荷密度、增强了蛋白间的静电相互作用，进而促进蛋白发生LLPS（如脆性X染色体智力迟滞蛋白FMRP），也可能因电荷排斥或空间位阻而抑制LLPS（如肉瘤融合蛋白FUS）[35-37]（图3a）。这种双向效应取决于特定蛋白质的序列分布、磷酸化位点位置及周围化学环境。此外，除常见的乙酰化、甲基化等修饰外，近年还涌现出乳酸酰化[38, 39]、棕榈酰化[40]等新型修饰方式。

2.2.2 小分子诱导法

化学小分子调控是继蛋白翻译后修饰之后，调节蛋白质LLPS的又一关键策略，展现出广阔的应用潜力。小分子与蛋白质之间弱相互作用能够改变蛋白表面的电荷分布与疏水暴露区域，重塑蛋白分子间的弱相互作用网络，最终影响相分离的驱动条件、凝聚体稳定性及其后续的相转化进程。以双-ANS（bis-ANS）这类带负电荷的芳香族小分子为例，其在低浓度下可通过静电与疏水协同作用促进蛋白凝聚体的形成，而在高浓度下则因电荷过筛效应产生静电排斥，使凝聚体发生可逆的再溶解，充分体现了小分子剂量依赖性调控LLPS的复杂性[41]。此外，多种天然及合成小分子已被证实在不同体系中对LLPS及相关病理聚集过程具有调控活性。杨梅素不干扰α-突触核蛋白α-Syn凝聚体的初始形成，但能以剂量依赖的方式延缓凝聚体内部的液-固相转变，从而有效抑制淀粉样纤维的聚集进程[42]。姜黄素则展现出明确的阶段特异性调控特征：在α-Syn凝聚体的组装阶段，姜黄素对其形成及早期形态无明显干预；但随着凝聚体进入成熟阶段，姜黄素通过降低其内部流动性，显著抑制了液-固相变的发生[43]。此外，该策略的应用不仅限于神经退行性疾病相关蛋白。Jack等人发现，抗病毒药物甲磺酸奈非那韦和尼洛替尼可显著改变冠状病毒N蛋白与RNA共凝聚体的数量、大小及形态[44]；而小分子环状二肽CDP能够有效抑制Tau蛋白的LLPS，并溶解已形成的相分离凝聚体，从而阻断其向纤维状聚集的转变[45]（图3b）。上述研究表明，小分子对LLPS的干预具有高度的体系依赖性和阶段特异性，其调控方向与效果往往取决于小分子结构、浓度及靶蛋白自身理化性质。相比于蛋白翻译后修饰，小分子诱导法更适合样品批量处理。同时，通过引入荧光基团，实现可视化、高通量筛选新型相分离调控分子。然而，该方法也存在固有局限，包括位点选择性不足、修饰产物异质性高，以及当前多数体系仍局限于体外环境，难以直接应用于活细胞中相分离过程的动态时空调控。

2.2.3 基因工程技术

基因工程技术从遗传信息源头出发，通过在DNA水平上改造蛋白质编码序列，实现遗传编码层面的相分离蛋白设计与构筑。与蛋白翻译修饰或外源添加小分子等调控手段不同，基因工程技术法从遗传信息的源头出发，直接在DNA水平上改造目标蛋白的编码序列。研究者可以依据相分离的序列规律（如内在无序区、多价相互作用位点等），人为设计特定的氨基酸排列或定点突变关键氨基酸，进而将相分离能力预设于蛋白的一级结构。这种从底层编码出发的设计策略，实现了对蛋白质LLPS行为的源头控制，为构筑新型相分离蛋白材料提供了根本性的技术路径。该方法能够产生化学组成均一、理化性质完全定制化的相分离蛋白，并在活细胞中获得长期稳定的表达。研究者通过向绿色荧光蛋白和腺苷酸激酶的N端和C端融合DEAD盒蛋白Dhh1和Dpb1肽段，利用Dhh1和Dpb1固有无序区域的LLPS能力，促使绿色荧光蛋白和腺苷酸激酶发生LLPS[47]。此外，

研究者将目标酶与LAF-1来源的RGG结构域融合，可将酶捕获至由温度或盐浓度变化引发的液体凝聚体中，实现区室化功能分配[48]。阳离子标签与球状结构域的融合已被证实可在大肠杆菌内诱导细胞内发生LLPS，且凝聚体的解聚过程受标签净电荷条件的精确调控[49]。同时，研究者将BTL2酶在其N端和C端分别与DEAD-box蛋白（Laf1）的RGG固有无序区相融合，该无序区驱动整个嵌合蛋白发生LLPS[46]（图3c）。此外，通过定点突变TDP-43蛋白的甘氨酸残基为丙氨酸，增强驱动相分离的螺旋倾向性，可显著增强体外相分离，并降低细胞内TDP-43报告区室的流动性[50]。基因工程法的核心优势在于蛋白质产物均一性高、遗传传递稳定、序列设计灵活性强，且与高通量筛选平台兼容性良好。然而，该方法仅适用于重组表达体系，且外源蛋白的过表达可能引发细胞毒性或导致非生理性的脱靶凝聚，因此在实际应用中需谨慎评估其表达水平、修饰状态及凝聚行为的剂量依赖性，并结合内源调控网络进行系统优化。

## 2.3 常用蛋白LLPS表征技术

LLPS是一个涵盖从分子构象动态到微观液滴物理性质、再到宏观相变行为的多尺度过程，其研究手段覆盖不同空间分辨率与时间窗口的技术手段。依据研究对象与维度的差异，将从以下四个方面揭示LLPS的物理化学特性与分子层面变化规律。

### 2.3.1 体外LLPS体系鉴定

体外LLPS验证是整个研究链条的起点，其核心目标在于确认目标蛋白是否具备相分离能力。浊度法是最基础的检测手段，通过测定溶液浊度随蛋白浓度的变化来确定LLPS发生的临界浓度。在此基础上，基于微流控芯片的系统实现了温度、离子强度等环境参数的自动化控制，并结合荧光检测快速优化LLPS条件，显著提升了筛选通量[51]。此外，将96孔板作为高通量筛选平台，借助高内涵成像系统自动采集明场或荧光图像。通过图像分析算法识别并量化特征性的球形液滴，评估LLPS行为[52]。在LLPS产物的形态表征方面，高分辨率显微镜可直接观察液滴形成过程、尺寸与形态特征。动态光散射则适用于测定凝聚体微滴的整体尺寸分布。荧光相关光谱可分别检测稀释相与致密相中的组分浓度，量化蛋白在两相间的分配系数[53]。冷冻电子显微镜可用于捕获亚微米尺度下的凝聚体超微结构细节，为理解其组装机制提供结构基础。借助荧光寿命成像探测液滴内部的微环境极性与成熟状态[53]。

### 2.3.2 单液滴表征技术

体外LLPS体系实验通常获得的是大量液滴的平均信息，而单液滴分析技术则将研究精度推进至单个凝聚体的层面，能够揭示液滴间的个体差异及其内部异质性。共聚焦显微镜、超分辨率显微镜和高速原子力显微镜等高分辨率成像技术可直接探测单个液滴内部的形态与结构特征[54, 55]。然而，这些技术难以提供残基特异性的分子层面信息。相比之下，单分子显微技术突破了传统光学显微镜的衍射极限，实现了对单个蛋白质或RNA分子在凝聚体内部运动轨迹的实时追踪，揭示了凝聚体并非均质液滴，而是具有空间异质性的动态渗透网络结构[56]。核磁共振波谱可提供凝聚相中原子/分子级的局部结构与动态信息，而小角X射线散射则反映纳米尺度的整体平均结构特征，如分子尺寸与形状轮廓[55, 57, 58]。但其获取的是整体平均信号，无法区分单个液滴的个体差异。为弥补上述不足，表面增强拉曼散射技术通过提高散射截面，实现在更低激光功率下单分子的检测与表征[59, 60]，不仅能够在单液滴分辨率下捕获残基特异性的结构信息，还可以逐个液滴地表征和量化关键分子[61]。该技术无需标记，可直接分析单个液滴的化学成分与内部蛋白浓度，利用水分子作为内部标准，通过分析液滴与周围环境中拉曼散射光的特征差异获取信息。此外，该技术可实现对单个凝聚体从成核、生长到溶解的全生命周期追踪分析。

### 2.3.3 液滴的流动性

液滴的流动性是判断LLPS产物是否为液态的核心依据，也是区分动态液滴与固态聚集体或凝胶态的重要标准。液滴融合是液态的直观判据，两个液滴接触后发生融合，并由界面张力驱动恢复球形，融合时间与粘度和界面张力相关。荧光漂白恢复

（Fluorescence Recovery After Photobleaching，FRAP）作为首选表征手段，通过高强度激光对液滴内选定区域进行光漂白，并监测荧光强度的恢复过程。根据漂白后荧光恢复的曲线，得到漂白区内分子浓度随时间重新分布的平均结果。荧光漂白恢复的定量结果高度依赖于分析模型，不同模型可能给出数量级差异的扩散系数。因此，该方法更适用于定性判别，难以精确测定扩散系数，且可能掩盖体系内在的异质性[62]。为克服这一局限，单颗粒追踪、单分子荧光共振能量转移及纳秒荧光相关光谱等技术无需依赖系综平均，即可揭示共存的构象亚群，表征凝聚体内分子在粘弹性网络中的运动特征[63，64]。单分子追踪通过记录单个荧光标记分子的轨迹并计算均方位移，能够区分自由扩散与受限扩散，揭示FRAP群体平均信号所掩盖的异质性。利用力学测量技术（如原子力显微镜、光镊、Brillouin显微镜等）也可测定液滴的粘弹性，再根据粘弹性的高低判断液体凝聚态或固态或凝胶态物质。在实际研究中，可先借助FRAP或液滴融合过程进行初步判别，继而以单分子追踪或原子力显微镜等方法加以补充验证，或据此对体系性质展开进一步深入探究。

2.3.4 其他表征技术

核磁共振波谱技术（尤其是$^{15}$N弛豫实验）是研究内在无序蛋白主链动态的理想工具，能够提供原子分辨率的皮秒至纳秒级重取向运动信息。时间分辨荧光光谱则可用于探测LLPS条件下蛋白分子的皮秒至纳秒级内部运动。电子顺磁共振技术通过距离依赖性方法，可以监测大规模结构重组的构象动力学变化[58，65]。而顺磁弛豫增强（PRE）利用顺磁中心对邻近核弛豫速率的$r^{-6}$依赖性增强效应，提供15-25 Å范围内的长程距离约束，用于解析凝聚相中分子的空间排列与溶剂可及性[66]。时间分辨超小角X射线散射和极小角中子散射可实时追踪温度跳变等外源扰动后液滴内部结构的整体演化路径[53]。等温滴定量热法通过直接测量分子间结合过程中释放或吸收的热量，可精确获得结合常数、焓变与熵变等热力学参数，用于定量解析LLPS中蛋白-核酸、蛋白-配体之间的相互作用强度与热力学驱动力[67]。这些技术手段在时间尺度与结构层次上相互补充，共同构建了从分子内动态到凝聚相整体行为、从皮秒到毫秒乃至宏观热力学的全链条表征体系，使我们对LLPS的分子机制、动态调控及生物功能有了更深入的理解。

## 3 基于LLPS构筑人工细胞的功能模块

人工细胞的组成通常可归纳为四个基本模块，即区室化、代谢与能量、遗传信息、分裂与生长[1，68]。区室化是最底层的前提，通常通过脂质/聚合物囊泡或凝聚层液滴建立物理边界，浓缩反应物实现与环境的区分。基于前文已设计的LLPS液滴已完成了区室化结构的构建。这是人工细胞的最底层前提，其核心功能在于浓缩反应物并实现物理边界区分。在此基础上，代谢与能量模块从外部获取物质与能量，维持系统处于非平衡的生命样状态。遗传信息模块封装转录翻译系统，使区室能依据内部指令合成功能蛋白并维持自身状态，从被动反应器转变为可编程实体。分裂与生长模块则利用代谢产物实现膜面积与内容物的增长，并通过物理机制完成分裂，使系统从自主维持迈向自我延续。这四个模块的层级关系并非固定不变的，但在概念逻辑上，边界→代谢→信息→分裂的次序对应了人工细胞从结构存在到功能自持再到自我复制的演进路径。模块的构建与集成是人工细胞从非生命组件走向生命样系统的核心路径，也是当前人工细胞领域面临的瓶颈问题。

### 3.1 能量供给模块

凝聚体作为人工细胞的原始模型，其能量供应与代谢研究正从催化容器转向耗散系统，核心进展在于利用ATP等化学燃料驱动凝聚体的可逆形成与解体以模拟生命系统的非平衡态特征，同时通过富集酶与底物在拥挤的凝聚相内加速代谢反应网络。凝聚体无膜、多孔的物理特性使其能够从周围环境中选择性富集ATP等能量分子。Nakashima等人利用丙酮酸激酶PyK催化ADP转化为ATP，驱动ATP与赖氨酸丰富蛋白K72发生LLPS，凝聚体在数分钟内即可形成并持续生长。

这个过程同时实现了能量分子生成和区室化结构构建，实现了能量模块和区室结构形成的集成过程[1, 69]。如图4a所示，Jia等构建的耗散型凝聚体系统中囊泡与凝聚体之间的可逆切换由ATP驱动，其本质是静电组装与疏水组装之间的平衡转换。具体而言，阳离子表面活性剂囊泡在ATP加入后，ATP作为多价阴离子与表面活性剂头基产生强烈的静电吸引，驱动LLPS并形成凝聚体；而当碱性磷酸酶ALP催化ATP水解后，维持凝聚体所需的静电交联被解除，表面活性剂分子重新由疏水效应主导，自发回到热力学更稳定的双层囊泡结构。该循环使系统处于持续消耗能量的非平衡态，模拟了细胞维持自身状态必须消耗ATP的基本逻辑[70]。在该体系中，ALP的加入使凝聚体在约60分钟内逐渐解体，补加ATP后凝聚体重新形成；五次循环后，凝聚体数量仍能恢复至初始值的约76% – 78%[70]。另一项基于双胍-磷酸盐桥连的凝聚体系统同样展示了酶剂量依赖的寿命调控：ALP浓度从10 U/mL提高到20 U/mL时，凝聚体半衰期从48 min缩短至24 min[71]。这些系统的共同逻辑是，ATP的水解速率决定凝聚体的寿命，能量消耗本身即构成解体的计时机制。

## 3.2　遗传信息模块

在体外，凝聚体区室结构可以选择性富集转录翻译组件，将基因表达限制在特定区室中，实现空间分隔与功能级联[72, 73]。如研究者利用内含无序蛋白形成的凝聚体作为内层区室，通过SYNZIP肽标签将T7 RNA聚合酶和模板DNA富集于IDP液滴中，使转录过程被限制在内层。转录产生的mRNA随后扩散至外层液滴，随后完成翻译[17]。这种空间分隔与功能级联过程模拟了真

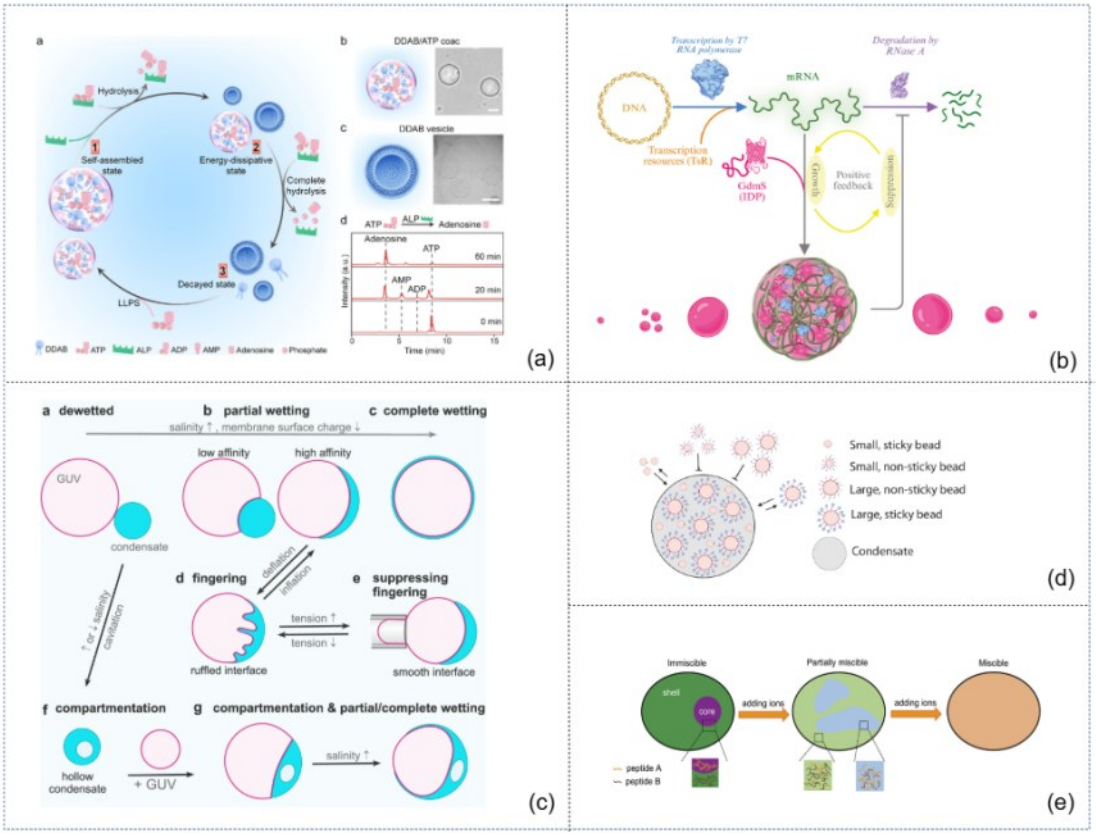



**图4**　基于LLPS构筑人工细胞的功能模块：（a）能量供给模块[70]，（b）遗传信息模块[74]，（c）膜-凝聚体耦合作用[76]，（d）物质交换模块[77]，（e）环境响应模块[78]

**Fig. 4**　Functional modules of artificial cells constructed based on LLPS: (a) energy supply module[70], (b) genetic information module[74], (c) membrane-condensate coupling [76], (d) material exchange module[77], (e) environmental response module[78]

核细胞中的核质分工。此外，以 Sf21 昆虫无细胞转录—翻译提取物为基础， T7 RNA 聚合酶以质粒 DNA 为模板转录生成 mRNA，mRNA 随后翻译为 GdmS 蛋白，完成 DNA→mRNA→蛋白的遗传信息表达（图 4b）。当 mRNA 与 GdmS 累积至相分离阈值时，二者自发共定位形成凝聚体区室，内部 mRNA 降解速率显著低于稀疏相，从而延长其寿命。转录资源耗尽后，mRNA 生产停止，凝聚体在稀疏相 mRNA 持续降解的驱动下自主溶解。表达产物既是凝聚体形成的驱动力，又通过调控 mRNA 降解速率反过来调节凝聚体自身的存续，形成由表达驱动、可自我调节的区室化行为[74]。凝聚体对翻译的调控还可通过 LLPS 的聚集/解聚实现可逆开关。研究者设计 pH 响应聚合物 CE-Dex，通过多价静电作用诱导无细胞蛋白合成系统发生 LLPS，将核糖体、酶及模板 DNA 等翻译组件浓缩并限制于凝聚体内，物理性关闭翻译。当 pH 升高至碱性（如病理微环境 pH≈8.3），CE-Dex 电荷改变，凝聚体秒级解离，翻译组件重新分散，核糖体结合 mRNA，蛋白合成重启[75]。该策略利用相分离的聚集/解聚来可逆地控制人工细胞的功能，为其在体内应用提供了新思路。可见，凝聚体对遗传物质的处理已涵盖空间分隔、动态储存、可逆调控与自主存续等多层次功能。上述无细胞表达体系不仅实现了遗传信息的处理，还伴随凝聚体区室结构形成与解离，完成了遗传信息与区室结构形成的集成，为人工细胞的多模块集成提供了技术支撑。

### 3.3 膜–凝聚体耦合作用

由于凝聚体是追求热力学极小化的球体液滴，且缺乏刚性边界。这种结构决定了它们难以积累足够的内在应力来克服表面张力，从而导致自发分裂变得极其困难。目前的研究主要集中在引入膜结构，模拟细胞壁的作用，再人为地提供外部力量或制造非平衡条件（如渗透压差），从而迫使凝聚体进行受控的形态变化和分裂。此外膜结构还能调控物质交换，显著提升结构稳定性并开启类细胞行为的可能性。蛋白凝聚体与膜之间是一种双向塑造的关系。膜锚定蛋白的相分离可增强脂质膜本身的相分离程度，Lee 等人证明具有强蛋白间相互作用的膜锚定蛋白系统能提升三元脂质混合物的相分离比例[79]。反之，膜的脂质组成也调控凝聚体的组装行为，PM 蛋白凝聚体倾向于在有序脂质域处成核，膜纳米域通过富集特定蛋白与脂质为凝聚体形成提供局部高浓度微环境[80]。在物理重塑方面，凝聚体通过润湿作用驱动膜形态变化。蛋白凝聚体通过 LLPS 形成后，可吸附于膜表面并发生润湿转变，从去润湿到部分润湿再到完全润湿，驱动膜的出芽、纳米管形成、界面褶皱乃至囊泡分裂等重塑过程[81]。例如，FUS LC 蛋白在膜表面相分离后产生面内压缩应力，驱动膜向内弯曲形成蛋白衬里的管状结构[82]。植物蛋白 FREE1 凝聚体则通过润湿作用诱导内体膜内陷和切割，足以在不依赖 ESCRT 机器和 ATP 的情况下介导腔内小泡形成[83]。与此同时，膜的脂质组成、电荷密度和相态也反过来调控凝聚体的亲和力与组装行为。如图 4c 所示，以大豆球蛋白凝聚体与两性离子型磷脂 DOPC 囊泡体系为例，低盐条件下静电排斥占主导，凝聚体呈去润湿态，而随盐浓度升高，离子屏蔽削弱排斥，体系依次转变为部分润湿态乃至完全铺展[76, 84]。与此同时，脂链长度、饱和度或胆固醇含量的增加会增强脂质堆积、减少膜的水合程度和凝聚体亲和力，使其从完全铺展退回到部分润湿乃至去润湿状态[76, 84]。因此，基于凝聚体构筑人工细胞时，若需引入膜结构，需考虑膜的结构组成对凝聚体的影响以及膜与凝聚体之间的相互作用。

### 3.4 选择性物质交换

无膜凝聚体缺乏脂质屏障，但与周围环境之间仍存在明确的相界面，可依据分子的大小、电荷、亲和力及界面性质，有差别地允许或阻止不同物质进出。小分子和代谢物往往能较快扩散通过，而大分子则可能因网眼筛分或缺乏亲和力而被排斥在外[77]（图 4d）。但当某分子与凝聚体内部的支架成分存在强相互作用时，即使尺寸较大也能被主动富集进去[77]。这种选择性不依赖膜通道蛋白，而由凝聚体自身的物理化学环境决定[85]。蛋白凝聚体的物质交换速率受多重因素共同调控。首先是界面阻力，凝聚体与稀相之间的界面并非自由通道，分子需克服能垒才能进出。通过荧光

漂白恢复实验观察到LAF-1凝聚体液滴扩散和内部弛豫仅需约64 s，但实测恢复时间长达1 h，其中超过3500 s来自界面阻力[86]。在老化的核磷蛋白凝聚体中观察到蛋白质交换的平均首次从32 s延长至230 s。这表明逐渐固化的界面层是限制物质交换的主要屏障[85]。此外，凝聚体尺寸通过表面体积比影响交换，较小液滴具有更大的表面体积比，交换效率更高，而较大的结构化蛋白液滴则交换更慢[87]。凝聚体可通过热力学分配选择性富集分子，其选择性取决于分子与凝聚体内部化学环境（极性、电荷、氢键能力等）的相容性差异。这种富集是被动的平衡态分配，凝聚体无法主动调控分子进出或逆浓度梯度富集，因而难以实现主动、可调控的选择性物质交换。然而，当向凝聚体体系引入能量模块，便可实现主动、可调控的选择性物质交换。如Barpuzary等构建了一种电燃料驱动的耗散性LLPS系统。该系统利用电化学反应网络调控氧化还原敏感肽，触发凝聚体的动态形成与消散，并无需膜结构即可实现荧光标记的寡核苷酸、蛋白质等分子的招募与定向运输。其机制类似于细胞中的布朗马达，通过主动凝聚、货物装载以及阴极附近的偏向性消散与释放之间的协同作用，实现时空可控的定向运输[88]。

### 3.5 环境响应模块

凝聚体环境响应刺激可分为接触式刺激与非接触式刺激两类。非接触式刺激（光、温度、超声等）具有远程、时空可控的优势，在活体应用场景方面具有独特优势。而接触式刺激（小分子、离子等）则更贴近天然细胞内的信号调控逻辑，特异性更强但作用范围有限。在人工细胞设计中，非接触式刺激可以作为外部操控手段，接触式刺激则赋予系统内部自主响应能力。

pH响应性通过质子化或去质子化改变蛋白质净电荷，从而调节静电排斥与吸引的平衡。异质核核糖核蛋白A1的低复杂度结构域介导其动态LLPS，pH变化改变氨基酸侧链的电离状态，影响蛋白质的净电荷分布和静电相互作用，从而决定LLPS的发生[89]。离子强度响应性通过改变溶液离子浓度调节蛋白质分子间的静电屏蔽效应，进而调控LLPS。如FUS在极低和极高离子强度下均保持可溶状态，而在中等离子强度范围，FUS发生LLPS形成凝聚体[78]（图4e）。死盒解旋酶4的N端低复杂度结构域形成的凝聚体通过静电相互作用（电荷-电荷和阳离子-π作用）稳定，在高离子强度下因电荷屏蔽效应而解聚分散[90]。离子强度还可与其他环境刺激协同作用，实现对凝聚体性质的多维度调控。如pH和盐浓度共同调控的hnRNPA1蛋白[89]，不同盐离子调控的弹性蛋白样多肽凝聚体[78]。此外，氧化还原信号[91, 92]、化学小分子[93]等也可参与调控凝聚体的组装与解离，进一步拓展环境响应性的调控维度。

温度作为调控信号，可根据凝聚体对温度响应的差异将其分为两类：低临界溶液温度型LCST在升温时诱导LLPS组装，降温则促使其重新溶解。高临界溶液温度型UCST行为相反，降温诱导LLPS组装，升温使其解聚。弹性蛋白样多肽是典型的LCST型体系[94]，而RGRGRG蛋白则表现出UCST型行为[95]。此外，部分蛋白质如UBQLN2的特定截短体可在不同温度区间同时展现LCST与UCST行为，形成闭合环状相图[94]。光作为调控信号，可通过光敏蛋白构象变化驱动凝聚体的组装与解离。红光照射诱导植物光敏色素B的GAF-PHY夹心结构解离，解除羧基端自抑制，暴露OPM结构域的寡聚能力。OPM介导的多价组装与氨基端无序区的弱多价相互作用协同，驱动核内LLPS形成光小体凝聚体[96]。研究者将拟南芥蓝光受体CRY2的PHR光敏模块与目标蛋白内在无序区融合。暗态下融合蛋白呈弥散分布，而蓝光照射后CRY2发生光依赖寡聚化，富集无序区形成局部高浓度，通过弱多价相互作用驱动LLPS的发生[97]。此外，脉冲电场的刺激也可参与调控凝聚体的组装与解离[98]。这些环境响应性为人工细胞的构筑提供了可编程的调控工具，使其能够模拟天然细胞对环境变化的动态感知，并为构建刺激响应型合成细胞系统奠定了基础。

## 4 基于蛋白LLPS的人工细胞功能化设计与应用

蛋白LLPS所形成的无膜液滴，凭借其独特的物理化学微环境、动态可逆的组装行为以及选择

性通透的界面特征，为人工细胞的构建提供了理想的物质基础与结构原型。这些液滴不仅在结构上模拟了天然细胞质的拥挤微区，更在功能上被逐步赋予类生命活动的执行能力，从而使人工细胞具备了最本质的结构特征与功能内核。在此基础上，通过理性设计液滴的组分构成与环境响应行为，基于蛋白LLPS的人工细胞正实现从结构模拟到功能集成的跨越，成为可定制化的人工细胞。为系统呈现其应用潜力，下文将从微型反应器、生物传感器、靶向治疗及药物递送四个维度，阐述基于蛋白LLPS的人工细胞功能化设计与应用进展。

### 4.1 微型反应器

在合成生物学领域，由LLPS驱动的无膜液滴，因构筑简单、通透性高、传质效率快且动态可调，成为微型反应器的理想载体。研究者以人工细胞的简化模型凝聚体为平台，在催化功能方面取得进展。例如，研究者利用融合低复杂度结构域的氯代儿茶酚1，2-双加氧酶形成具有天然催化活性的凝聚体，用于高效降解4-氯代儿茶酚，为多环芳烃污染的生物修复提供了解决方案[103]。研究者利用类弹性蛋白多肽RLP凝聚体，借助其界面电场与内部独特的电化学微环境，促进底物富集与偶极对齐，进而推动胺对羰基化合物的亲核攻击，驱动非酶促还原胺化反应，在胺与醛/酮之间构建C-N键[16]。值得注意的是，尽管合成无膜细胞器内部酶或底物的浓度表观上更高，但这也可能导致特定反应速率的抑制[104]。此外，研究者通过在酵母等微生物中构建人工凝聚体，对工程代谢途径进行区室化调控[105，106]。研究显示，紫杉醇前体及丁醇等代谢途径经人工细胞微型反应器介导的酶区室化后，产量提升可达2-5倍[107]。研究者在酿酒酵母中构建了基于RGG-（WGR-1）n架构的微型反应器，将角鲨烯合成途径的关键酶ERG20与IDI1靶向招募至凝聚体内部，使角鲨烯产量提升34.5%[99]（图5a）。酶和底物的隔室化有利于促进酶与底物碰撞的频率，从而促进亚态-酶复合物的形成，并通过降低反应自由能提升反应动力学。类似地，研究者在大肠杆菌中构建基于极性脚手架蛋白PodJ的微型反应器，将乳糖-N-四糖合成途径的分散酶能够局部浓缩至该反应器内部。同时酶-底物相互作用频率提升，使目标产物产量较野生型提升4.71倍[14]。可见，凝聚体作为微型反应器，对反应速率的影响具有条件依赖性：局部富集可加速反应，底物抑制或扩散受限则可能降低反应速率。凝聚体作为微型反应器，其反应调控取决于底物分配、扩散限制及微环境动力学等因素。

### 4.2 生物传感器

凝聚体通过相分离将分析物或探针在局部空间浓缩，将原本微弱的分子识别事件转化为可检测的、可编程的化学或光学信号输出。例如Green等人构建了聚精氨酸/ATP肽凝聚体，将DNA分子信标及其互补靶标共同富集于凝聚相内。凝聚体内部的寡核苷酸局部浓度显著提高，使分子信标的检测限降低超过20倍。这意味着在人工细胞系统中，即使目标核酸浓度极低，凝聚体的富集效应也能将其“拉入”检测范围，从而提升信号处理的灵敏度阈值[100]（图5b）。Lyu等人利用蛋白质三聚化结构域介导的LLPS，在CRISPR靶位点实现荧光蛋白的指数级富集。当dCas9融合蛋白在靶DNA位点形成凝聚体时，大量荧光标记蛋白被招募到该局部区域，使非重复DNA位点的成像信号强度显著增强，信噪比大幅提升。这一策略直接解决了活细胞成像中单拷贝基因位点信号过弱的问题，为人工细胞中基于CRISPR的靶标识别与报告提供了高灵敏度读出手段[108]。研究者通过对丙酮酸依赖性阻遏蛋白PdhR融合内在无序区，使其在体外发生LLPS，所得凝聚体保留了DNA结合能力，但结合状态受丙酮酸浓度控制。DNA被招募至凝聚体后，其转录单元活性受到强烈抑制。而加入丙酮酸后，转录活性得以可逆且剂量依赖地恢复[109]。该凝聚体实现了代谢信号与转录信号耦联，为设计自下而上合成生物系统刺激响应性传感器材料提供新思路。上述进展表明，基于LLPS的人工细胞系统在分子富集浓缩、阈值响应与可逆开关控制方面展现出多样化的功能潜力，实现了从分子识别到信号输出的功能拓展。

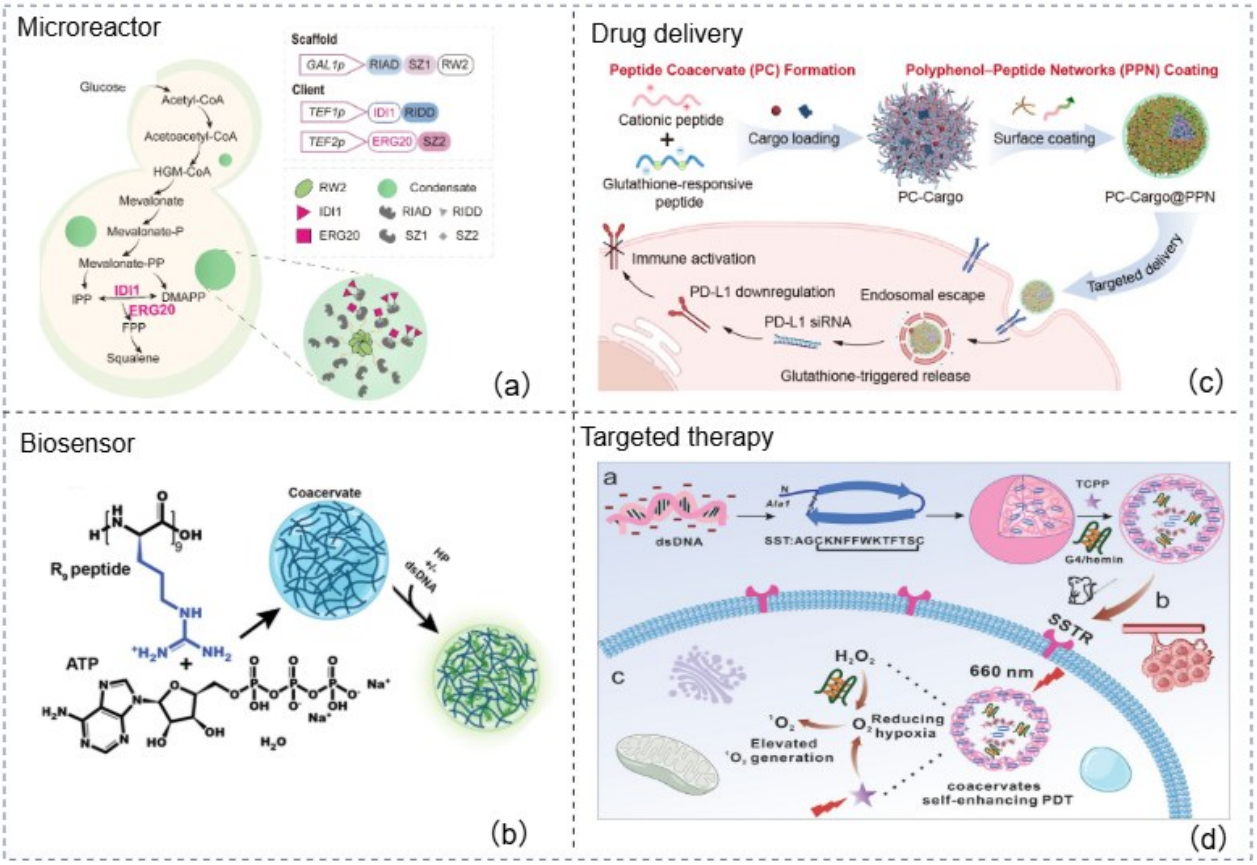



**图 5**　LLPS 在不同领域的应用：（a）微型反应器[99]，（b）生物传感器[100]，（c）药物递送[101]，（d）靶向治疗[102]

**Fig. 5**　Applications of LLPS in different fields: (a) microreactors [99], (b) biosensors[100], (c) drug delivery[101] , (d) targeted therapy[102]

### 4.3　药物递送

在药物递送领域，LLPS 驱动的凝聚体液滴正被开发为一类新型药物递送平台，尤其适用于抗体、质粒、mRNA 等大分子治疗剂的高效细胞内递送。相较于传统脂质体或聚合物纳米载体，凝聚体凭借其液-液相界面的动态通透性、高载药能力及优异生物相容性，在实现高效细胞摄取的同时可显著降低载体相关毒性，由此展现出作为人工细胞递送系统的独特优势。研究者设计了一类共轭肽，其通过液-液相分离形成 pH 与氧化还原响应性凝聚体微液滴。该凝聚体可快速招募小肽、分子量高达 430 kDa 的酶及 mRNA 等多种大分子货物。负载治疗分子后，凝聚体绕过内吞途径直接进入胞质，在谷胱甘肽介导下释放负载物。释放后的酶与肽保留生物活性，mRNA 则表现出高转染效率。这一过程借助相行为的刺激响应性，实现了治疗分子的胞内递送与可控释放[110]。另一项研究也构建了响应性肽凝聚体胞内递送平台，但其在凝聚层表面包覆多酚-肽网络壳层，以赋予胶体稳定性并调控凝聚层－细胞相互作用，从而实现细胞特异性摄取，进而将毒性蛋白、促凋亡肽、功能性酶及质粒 DNA 等生物大分子高效递送至细胞质[101]（图 5c）。除共轭肽体系外，多种天然或生物兼容性材料亦被用于构建凝聚体递送平台。其中以胆固醇修饰的单链 DNA 与组蛋白为构筑单元，通过 LLPS 组装形成凝聚体囊泡。该囊泡可在温和条件下包载病毒颗粒、mRNA、细胞因子和多肽等多种生物药物并保持其生物活性。其尺寸在微米级，恰好落入大胞饮的尺寸窗口，因而可通过受体非依赖且能量依赖的大胞饮过程进入细胞；凭借这一途径，其对溶瘤病毒的内化效率可达游离病毒的 48 倍。在荷瘤小鼠模型中，该载体进一步促进了溶瘤病毒的驻留并增强了其治疗效果[111]。此外，富含甘氨酸蛋白可以诱导形成 pH 响应性凝聚体，用于封装姜黄素等治疗分子[112]。明

胶-A与明胶-B形成的复合凝聚层可以高效包裹沙丁胺醇硫酸盐，并在低pH模拟胃液中通过双相释放行为延缓其释放，从而调控药物的释放动力学[113]。上述研究表明，LLPS液滴人工细胞凭借其独特的相界面特性、灵活的载药能力及可控的释放行为，为多种治疗药物和生物分子治疗剂的精准递送提供了一种极具潜力的智能递送方式。

### 4.4 靶向治疗

随着对病理性相分离事件认识的深入，基于LLPS的人工细胞策略在靶向治疗中的应用不断拓展。这些研究从不同角度切入：一方面利用凝聚体作为递送载体，通过配体-受体识别实现主动靶向；另一方面将靶向对象扩展至疾病相关的蛋白质凝聚体本身，通过调控其组装或解聚直接干预病理过程。在载体递送方面，由双链DNA与生长抑素（SST）构建的多相“核-壳”凝聚体，通过SST与肿瘤细胞表面SST受体的结合实现主动靶向。G4四链体-血红素复合物可嵌入凝聚体内部，并进一步招募光敏剂四羧基苯基卟啉，形成光敏性复合材料。该凝聚体利用G4-血红素的类过氧化氢酶活性将氧气转化为单线态氧，增强光动力治疗效果，在体外抑制肿瘤细胞迁移，在体内抑制肿瘤生长[102]（图5d）。在相态干预方面，借助调控凝聚体的组装或解聚，人工细胞能够干预传统疗法难以触及的蛋白质功能网络，从而精准介入癌症、神经退行性疾病等复杂病理过程。例如肝癌细胞中的赖氨酸乙酰转移酶8作为LLPS转录凝聚体的核心驱动因子，与IRF1协同维持PD-L1转录表达，帮助肿瘤细胞逃避免疫监视。针对这一机制，研究者设计的囊泡-脂质体递送体系阻断PD-L1表面信号，瓦解维持PD-L1表达的相分离凝聚体，有效抑制肿瘤生长并延长模型动物生存期，为肝癌免疫治疗提供了协同增效新路径[114]。在神经退行性疾病领域，研究者构建了双功能相态调控器JSF1，其由FUS蛋白LCD片段通过光可切割连接子与聚精氨酸序列共轭而成。黑暗条件下，JSF1作为高价位客户分子增强FUS的LLPS并提高其凝聚体流动性。光照下，光切割释放的FUS50–60片段诱导FUS凝聚体向淀粉样纤维转变。该案例表明，基于LLPS的人工细胞器可通过外部刺激响应性调控天然凝聚体的相态，为靶向病理性蛋白凝聚提供了新工具[115]。上述研究表明，LLPS液滴人工细胞在靶向治疗中既可作为药物递送载体，通过配体-受体识别提高递送选择性，也可作为病理调控工具，通过调控病理性相分离事件干预病理过程，为癌症、神经退行性疾病等难治性疾病的靶向治疗提供了新策略。

## 5 总结与展望

基于蛋白LLPS的人工细胞已在微反应器、生物传感器、药物递送与靶向治疗等领域展现出多样化的应用潜力。然而，其实际应用仍面临持续供能不足、功能寿命有限、区室串扰难以控制等挑战。未来研究仍需围绕这些关键问题展开深入探索。

在持续供能方面，当前研究已从静态组装迈入非平衡态维持的初步验证阶段，但距离真正的长效运行仍有显著差距。化学燃料驱动的耗散体系是当前最接近持续做功的实验范式，而核心制约在于ATP与NAD（P）H等能量分子的再生效率。因此，未来发展方向将聚焦于以下三个层面：1）将ATP再生模块与凝聚体支架蛋白融合表达，直接锚定于凝聚体界面，以缩短能量传递距离、提高原位利用效率。2）开发NAD（P）H与ATP协同再生系统，为更复杂的代谢网络提供持续还原力与能量供给。3）建立内源反馈回路，使系统从被动响应外源信号跃升至根据自身代谢状态自主调节功能输出的层次。

在功能寿命方面，凝聚体老化过程中从液态向类固态的转变是限制其长效运行的核心障碍。通过翻译后修饰或引入表面活性剂样客户分子调控界面性质，是延缓固化、延长功能窗口的有效策略[116]。因此未来发展方向将聚焦于以下三个层面：1）系统解析不同翻译后修饰类型及其组合对界面流变学的调控规律，建立修饰类型—界面性质—功能寿命的定量映射。2）设计可响应特定刺激的智能表面活性剂，实现界面性质的时空可控切换。3）探索通过柔性间隔序列、可逆交联贴纸对或分子伴侣靶向干预界面固化区域，实现界面

重塑以恢复流动性。

在区室串扰方面，凝聚体与膜系统及多凝聚体之间的信号与物质交换边界是决定人工细胞功能兼容性的核心问题。当前面临的两个主要问题：第一，凝聚体与脂质膜接触时发生相互重塑，产生界面褶皱等复杂结构。第二，多凝聚体共存时，共享客户分子或支架组分可引发竞争性串扰，使共存区域收缩甚至抑制相分离。现有方法通过逻辑门控系统初步实现了凝聚体共组装与分离的编程化控制[5]，或借助正交体系构建了不混溶的二元无膜细胞器，实现货物蛋白的靶向定向传递[117]。未来方向应聚焦于以下三个方面：1）定量解析多凝聚体共存时共享组分引发的竞争性串扰规律，明确不同客户分子亲和力、浓度与分配系数的定量关系，为隔离策略提供理论依据。2）开发基于正交相互作用的区室隔离体系，利用DNA可编程凝聚体等序列定义的正交平台，实现多区室系统中功能模块的独立运行与可控通讯。3）利用膜-凝聚体界面的选择性润湿实现功能模块的空间定位与动态重组，将被动耦合转化为可编程的界面工程工具。

上述问题的解决将显著提升LLPS人工细胞的应用能力。持续供能问题解决后，系统可自主从环境摄取燃料并原位再生ATP/NAD（P）H，功能持续时间从小时级延伸至天级。药物递送单次给药即可维持长效治疗浓度，而生物传感也可实现连续监测。功能寿命延长后，凝聚体可在数天至数周内维持液态流动性与催化活性。在靶向治疗中，凝聚体可完成病灶富集、渗透与释放的全过程。区室串扰实现可控之后，不同凝聚体可分别执行独立功能而互不干扰。当三个问题协同解决时，系统将具备自主调节能力，人工细胞能够根据环境变化动态调整功能输出。

## 参 考 文 献


[1] Hazegh N, Arjan D, Angshuman V, et al. Bottom-up coacervate-based artificial cells: integrating cellular hallmarks into complex life-like systems [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2026, 65(22): e00002.

[2] Ren Y, Wang W, Zhao J, et al. Light/NADH bistimulation ATP synthesis artificial organelles for nitrogen assimilation and RNA transcription in artificial cells [J]. JACS Aurum, 2026, 6 (7): 4085-4095.

[3] Schindler J, Nothwang H G. Aqueous polymer two-phase systems: effective tools for plasma membrane [J]. Proteomics, 2006, 6(20): 5409-5417.

[4] Brangwynne C P, Eckmann C R, Courson D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation [J]. Science, 2009, 324(5935): 1729-1732.

[5] Shin Y, Brangwynne C P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease [J]. Science, 2017, 357(6357): eaaf4382.

[6] Chattaraj A, Baltaci Z, Chung S, et al. Measurement of solubility product reveals the interplay of oligomerization and self-association for defining condensate formation [J]. Molecular Biology of the Cell, 2024, 35(9): ar122.

[7] Tong S, Zhang J, Diao C, et al. Tuning the liquid-liquid phase separation of FUS by phosphorylation: a role of domain-specific compensation [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2026, 130(4): 1437-1446.

[8] Ye O V, Werth E G, Brown L M, et al. Formation of biomolecular condensates in bacteria by tuning protein electrostatics [J]. ACS Central Science, 2020, 6(12): 2301-2310.

[9] Zhang Z, Wang B, Chen J, et al. Modification of plant and algal proteins through the Maillard reaction and complex coacervation: mechanisms, characteristics, and applications in encapsulating oxygen-sensitive oils [J]. Sustainable Food Technology, 2024, 2(3): 567-593.

[10] Meng F, Li J, Yang C, et al. Rheological and tribological properties of high internal phase emulsions stabilized by pH-induced soy protein isolate-carrageenan complex coacervates [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 146: 109191.

[11] Dai X, Zhao D, Matsumura K, et al. Polyampholytes and their hydrophobic derivatives as excipients for suppressing protein aggregation [J]. ACS Applied Bio Materials, 2023, 6(7): 2738-2746.

[12] 刘佳旭, 丁一凡, 张晓彦, 等. 液-液相分离调控酶活性的机制与应用进展 [J]. 生物工程学报, 2026, 42(3): 1118-1135.
Liu J X, Ding Y F, Zhang X Y, et al. Mechanisms and applications of liquid-liquid phase separation in enzyme activity regulation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2026, 42(3): 1118-1135.

[13] Chen C, Li J. Recent advances in coacervate protocells from passive catalysts to chemically programmable systems [J].

Communications Chemistry, 2026, 9(1): 76.

[14] Yao B, Zhou J, Su X, et al. Engineering polar protein-based biomolecular condensates for modular biosynthesis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2026, 341: 149961.

[15] Dai Y, Chamberlayne C F, Messina M S, et al. Interface of biomolecular condensates modulates redox reactions [J]. Chem, 2023, 9(6): 1594-1609.

[16] Song X, Ma Y, Chen M W, et al. Biomolecular condensates mediate C–N bond formation [J]. Nature Chemical Biology, 2026, 22(7): 1165-1175.

[17] Tomohara K, Minagawa Y, Noji H. Artificial cells with all-aqueous droplet-in-droplet structures for spatially separated transcription and translation [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 627.

[18] Tong W, Fei Y, Deng Y, et al. Creation of artificial subcellular organelles using compartmentalized escherichia coli bodies for artificial metalloenzyme-mediated abiotic catalysis in eukaryotic cells [J]. Journal American Chemical Society, 2025, 147(18): 15229–15241.

[19] Jiang S, Li H, Zhang L, et al. Generic Diagramming Platform (GDP): a comprehensive database of high-quality biomedical graphics [J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53(D1): D1670-D1676.

[20] Rodriguez C B, Tunque Cahui R R, Demitroff N, et al. BAV-LLPS: a database of bacterial, archaea, and virus liquid-liquid phase separation proteins [J]. Bioinformatics, 2025, 41(10): btaf550.

[21] Mészáros B, Erdős G, Szabó B, et al. PhaSePro: the database of proteins driving liquid–liquid phase separation [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D360-D367.

[22] Ning W, Guo Y, Lin S, et al. DrLLPS: a data resource of liquid–liquid phase separation in eukaryotes [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D288-D295.

[23] You K, Li R, Lian R, et al. PhaSepDB 3.0: a comprehensive knowledgebase of phase separation-related proteins from AI-assisted curation [J]. Nucleic Acids Research, 2026, 54(D1): D445-D450.

[24] Wang X, Zhou X, Yan Q, et al. LLPSDB v2.0: an updated database of proteins undergoing liquid-liquid phase separation in vitro [J]. Bioinformatics, 2022, 38(7): 2010–2014.

[25] Bolognesi B, Lorenzo Gotor N, Dhar R, et al. A concentration-dependent liquid phase separation can cause toxicity upon increased protein expression [J]. Cell Reports, 2016, 16(1): 222-231.

[26] Vernon R M, Chong P A, Tsang B, et al. Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation [J]. eLife, 2018, 7: e31486.

[27] Kumar R, Koo D H, Eom Y G, et al. Biomolecular phase separation through theoretical and computational microscope [J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2024, 45(5): 420-434.

[28] Wilson C, Lewis K A, Fitzkee N C, et al. ParSe 2.0: A web tool to identify drivers of protein phase separation at the proteome level [J]. Protein Science, 2023, 32(9): e4756.

[29] Chu X, Sun T, Li Q, et al. Prediction of liquid-liquid phase separating proteins using machine learning [J]. BMC Bioinformatics, 2022, 23(1): 72.

[30] Cai H, Vernon R M, Forman-Kay J D. An interpretable machine-learning algorithm to predict disordered protein phase separation based on biophysical interactions [J]. Biomolecules, 2022, 12 (8): 1131.

[31] Cao S, Ivanov T, Heuer J, et al. Dipeptide coacervates as artificial membraneless organelles for bioorthogonal catalysis [J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 39.

[32] Peng S, Zhang X, Shi X L, et al. Diastereomeric configuration codulates liquid–liquid phase separation and catalysis in minimalist dipeptide coacervates [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2026, 65(29): e9390195.

[33] Abbas M, Lipiński W P, Nakashima K K, et al. A short peptide synthon for liquid–liquid phase separation [J]. Nature Chemistry, 2021, 13(11): 1046-1054.

[34] Xie X, Li T, Ma L, et al. A designer minimalistic model parallels the phase-separation-mediated assembly and biophysical cues of extracellular matrix [J]. Nature Chemistry, 2025, 17(8): 1216-1226.

[35] Owen I, Shewmaker F. The role of post-translational modifications in the phase transitions of intrinsically disordered proteins [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(21): 5501.

[36] Li J, Zhang M, Ma W, et al. Post-translational modifications in liquid-liquid phase separation: a comprehensive review [J]. Molecular Biomedicine, 2022, 3(1): 13.

[37] Monahan Z, Ryan V H, Janke A M, et al. Phosphorylation of the FUS low-complexity domain disrupts phase separation, aggregation, and toxicity [J]. The EMBO Journal, 2017, 36 (20): 2951-2967.

[38] Wang X, Liu J, Mao C, et al. Lactylation-regulated biomolecular condensates: metabolic control of phase separation in physiology and disease [J]. Cell Communication

and Signaling, 2025, 23(1): 239.

[39] Li H, Liu C, Li R, et al. AARS1 and AARS2 sense l-lactate to regulate cGAS as global lysine lactyltransferases [J]. Nature, 2024, 634(8036): 1229-1237.

[40] Zou G, Tang Y, Yang J, et al. Signal-induced NLRP3 phase separation initiates inflammasome activation [J]. Cell Research, 2025, 35(6): 437-452.

[41] Babinchak W M, Dumm B K, Venus S, et al. Small molecules as potent biphasic modulators of protein liquid-liquid phase separation [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5574.

[42] Xu B, Mo X, Chen J, et al. Myricetin inhibits α-Synuclein amyloid aggregation by delaying the liquid-to-solid phase transition [J]. ChemBioChem, 2022, 23(16): e00216.

[43] Xu B, Chen J, Liu Y. Curcumin Interacts with α-Synuclein Condensates to inhibit amyloid aggregation under phase separation [J]. ACS Omega, 2022, 7(34): 30281-30290.

[44] Jack A, Ferro L S, Trnka M J, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein forms condensates with viral genomic RNA [J]. PLOS Biology, 2021, 19(10): e3001425.

[45] Ramesh M, Balachandra C, Baruah P, et al. Cyclic dipeptide-based small molecules modulate zinc-mediated liquid–liquid phase separation of tau [J]. Journal of Peptide Science, 2023, 29(5): e3465.

[46] Stoffel F, Papp M, Gil G M, et al. Enhancement of enzymatic activity by biomolecular condensates through pH buffering [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 6368.

[47] Faltova L, Küffner A M, Hondele M, et al. Multifunctional protein materials and microreactors using low complexity domains as molecular adhesives [J]. ACS Nano, 2018, 12(10): 9991-9999.

[48] Li X, Kuchinski L M, Park A, et al. Enzyme purification and sustained enzyme activity for pharmaceutical biocatalysis by fusion with phase-separating intrinsically disordered protein [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2024, 121(10): 3155-3168.

[49] Yeong V, Wang J W, Horn J M, et al. Intracellular phase separation of globular proteins facilitated by short cationic peptides [J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 7882.

[50] Conicella A E, Dignon G L, Zerze G H, et al. TDP-43 α-helical structure tunes liquid–liquid phase separation and function [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(11): 5883-5894.

[51] Bremer A, Mittag T, Heymann M. Microfluidic characterization of macromolecular liquid–liquid phase separation [J]. Lab on a Chip, 2020, 20(22): 4225-4234.

[52] Li Y, Gu J, Liu C, et al. A high-throughput method to profile protein liquid-liquid phase separation [M]//Zhou H X, Spille J H, Banerjee P R. Phase-separated biomolecular condensates: methods and protocols. New York, NY; Springer US. 2023: 261-268.

[53] Villegas J A, Heidenreich M, Levy E D. Molecular and environmental determinants of biomolecular condensate formation [J]. Nature Chemical Biology, 2022, 18(12): 1319-1329.

[54] Ganser L R, Myong S. Methods to study phase-separated condensates and the underlying molecular interactions [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2020, 45(11): 1004-1005.

[55] Alberti S, Gladfelter A, Mittag T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates [J]. Cell, 2019, 176(3): 419-434.

[56] Sumrall E R, Husna S M A, Halder B, et al. Single-molecule microscopy of biomolecular condensates: From liquid droplets to heterogeneous networks [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2026, 98: 103271.

[57] Rai S K, Savastano A, Singh P, et al. Liquid–liquid phase separation of tau: From molecular biophysics to physiology and disease [J]. Protein Science, 2021, 30(7): 1294-1314.

[58] Emmanouilidis L, Esteban H L, Damberger F F, et al. NMR and EPR reveal a compaction of the RNA-binding protein FUS upon droplet formation [J]. Nature Chemical Biology, 2021, 17 (5): 608-614.

[59] Zong C, Xu M, Xu L-J, et al. Surface-enhanced raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges [J]. Chemical Reviews, 2018, 118(10): 4946-4980.

[60] Langer J, Jimenez A D, Aizpurua J, et al. Present and future of surface-enhanced raman scattering [J]. ACS Nano, 2020, 14 (1): 28-117.

[61] Avni A, Joshi A, Walimbe A, et al. Single-droplet surface-enhanced Raman scattering decodes the molecular determinants of liquid-liquid phase separation [J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 4378.

[62] Alberti S, Hyman A A. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021, 22(3): 196-213.

[63] Melentiev P N, Kalmykov A S, Gritchenko A S, et al. Optical methods for the detection of single biomolecules: visualization, detection and sequencing of DNA molecules [J]. Physics-uspekhi, 2024, 67: 1069-1083.

[64] Pati A K, Kilic Z, Martin M I, et al. Recovering true FRET efficiencies from smFRET investigations requires triplet state

mitigation [J]. Nature Methods, 2024, 21(7): 1222-1230.

[65] Ambadipudi S, Biernat J, Riedel D, et al. Liquid–liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau [J]. Nature Communications, 2017, 8 (1): 275.

[66] 赵尉杰, 朱程君, 梁晋铭, 等. 面向细胞液-液相分离的医工检测方法研究进展 [J]. 机械制造与自动化, 2025, 54(2): 1-13.
Zhao W J,Zhu C J,Liang J M,et al. Research progress of liquid-liquid phase separation and detection methods in cells[J]. Machine Building & Automation, 2025, 54(2): 1-13.

[67] Lin Y, Fichou Y, Rauch J N, et al. Mapping phase diagram of Tau-RNA LLPS under live cell coculturing conditions [M]// Cieplak A S. Protein Aggregation: Methods and Protocols. New York, NY; Springer US. 2023: 269-284.

[68] Han H, Song S, Pu Y, et al. Polymeric artificial cells: from interfacial membranization to cytomimetic architecture engineering [J]. Biomacromolecules, 2026, 27(1): 87-111.

[69] Yaghini N. Predicting the growth and dynamics of ATP-based protocells through modeling [J]. Physica Scripta, 2025, 100 (10): 105003.

[70] Jia L, Qiao Y. Protocells with ATP-fueled dissipative behaviors as functional regulators [J]. Journal of the American Chemical Society, 2025, 147(49): 45004-45014.

[71] Srivastava A, Kumar P, Punugusamy M, et al. Adaptive catalytic compartments emerge from synergistic integration of DNA nanostructures and transient coacervates [J]. Nanoscale Horizons, 2025, 10(12): 3319-3329.

[72] 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.

[73] 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.

[74] Ghosh A, Thatte A, Suraritdechachai S, et al. Transcription-driven phase separation of synthetic condensates enables self-organizing compartments and protective microenvironments [J]. Cell Reports Physical Science, 2026, 7(8): 103481.

[75] 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.

[76] Mangiarotti A, Chen N, Zhao Z, et al. Wetting and complex remodeling of membranes by biomolecular condensates [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 2809.

[77] Kelley F M, Ani A, Pinlac E G, et al. Controlled and orthogonal partitioning of large particles into biomolecular condensates [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 3521.

[78] Zhu L, Pan Y, Hua Z, et al. Ionic effect on the microenvironment of biomolecular condensates [J]. Journal of the American Chemical Society, 2024, 146(20): 14307-14317.

[79] Lee I H, Imanaka M Y, Modahl E H, et al. Lipid raft phase modulation by membrane-anchored proteins with inherent phase separation properties [J]. ACS Omega, 2019, 4(4): 6551-6559.

[80] Wang A, Su B, Shan X. An under-recognized nexus: the interplay between plasma membrane nanodomains and protein condensates in plant cellular organization [J]. Journal of Experimental Botany, 2026, 77(14): 4210-4214.

[81] Mangiarotti A, Dimova R. Biomolecular condensates in contact with membranes [J]. Annual Review of Biophysics, 2024, 53: 319-341.

[82] Yuan F, Alimohamadi H, Bakka B, et al. Membrane bending by protein phase separation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(11): e2017435118.

[83] Wang Y, Li S, Mokbel M, et al. Biomolecular condensates mediate bending and scission of endosome membranes [J]. Nature, 2024, 634(8036): 1204-1210.

[84] Mangiarotti A, Sabri E, Schmidt K V, et al. Lipid packing and cholesterol content regulate membrane wetting and remodeling by biomolecular condensates [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 2756.

[85] He Y, Ongwae G M, Mondal A, et al. A high-throughput, flow cytometry approach to measure phase behavior and exchange in biomolecular condensates [J]. Nature Communications, 2026, 17(1): 1337.

[86] Zhang Y, Pyo A G T, Kliegman R, et al. The exchange dynamics of biomolecular condensates [J]. eLife, 2024, 12: RP91680.

[87] Novakovic M, Han Y, Kathe N C, et al. LLPS REDIFINE allows the biophysical characterization of multicomponent condensates without tags or labels [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 4628.

[88] Barpuzary D, Selmani S, Zeinalvand L, et al. Electrically Fueled Liquid-Liquid Phase Separation for Active Transport [J/OL]. Advanced Materials, 2026, e75269 Electronic)).

[89] Tsoi P S, Ferreon J C, Ferreon A C. Initiation of hnRNPA1 low-complexity domain condensation monitored by dynamic light scattering [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(13): 6825.

[90] Nott Timothy j, Petsalaki E, Farber P, et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles [J]. Molecular Cell, 2015, 57(5): 936-947.

[91] Harami G M, Pálinkás J, Kovács Z J, et al. Redox-dependent condensation and cytoplasmic granulation by human ssDNA-binding protein-1 delineate roles in oxidative stress response [J]. iScience, 2024, 27(9): 110788.

[92] Lin Y, Zhou X, Kato M, et al. Redox-mediated regulation of an evolutionarily conserved cross- β structure formed by the TDP43 low complexity domain [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(46): 28727-28734.

[93] Liu C, Zeng Q, Ju X, et al. Ponceau S as a targeted modulator for protein liquid – liquid phase separation [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(20): 10570-10577.

[94] Raymond S P, Bucknor B, Yang Y, et al. A spectrophotometric turbidity assay to study liquid-liquid phase separation of UBQLN2 in vitro [M]//Cieplak A S. Protein Aggregation: Methods and Protocols. New York, NY; Springer US. 2023: 515-541.

[95] Han Y, Cheng K, Chen K, et al. Tailoring multiphasic protein condensates via liquid-liquid phase separation [J]. Aggregate, 2026, 7(4): e70336.

[96] Chen D, Lyu M, Kou X, et al. Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B [J]. Molecular Cell, 2022, 82(16): 3015-3029.

[97] Shin Y, Berry J, Pannucci N, et al. Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optoDroplets [J]. Cell, 2017, 168(1-2): 159-171.e114.

[98] Wang M, Falke S, Schubert R, et al. Pulsed electric fields induce modulation of protein liquid – liquid phase separation [J]. Soft Matter, 2020, 16(37): 8547-8553.

[99] Jin K, Yu W, Liu Y, et al. Light-induced programmable solid – liquid phase transition of biomolecular condensates for improved biosynthesis [J]. Trends in Biotechnology, 2025, 43 (6): 1403-1424.

[100] Green C M, Sementa D, Mathur D, et al. Sequestration within peptide coacervates improves the fluorescence intensity, kinetics, and limits of detection of dye-based DNA biosensors [J]. Communications Chemistry, 2024, 7(1): 49.

[101] Jiang L, Song Q, Lin Z, et al. Targeted coacervates enabled by polyphenol – peptide networks for therapeutic delivery [J]. Journal of the American Chemical Society, 2026, 148(22): 23293-23304.

[102] Sun W, Xiong H, Yin J, et al. Construction of somatostatin-based multiphase "core – shell" coacervates as photodynamic biomimetic organelles [J]. Advanced Healthcare Materials, 2025, 14(2): 2403561.

[103] Evangelista N N, Micheletto M C, Kava E, et al. Biomolecular condensates of Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase as prototypes of enzymatic microreactors for the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 270: 132294.

[104] Peeples W, Rosen M K. Mechanistic dissection of increased enzymatic rate in a phase-separated compartment [J]. Nature Chemical Biology, 2021, 17(6): 693-702.

[105] 郭树奇, 焦子悦, 费强. 基于化学品生物合成的嗜甲烷菌人工细胞构建及应用进展 [J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 1017-1029.
Guo S Q, Jiao Z Y, Fei Q. Advances in construction and application of artificial cells of methanotrophs based on chemical biosynthesis [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2 (6): 1017-1029.

[106] 刘啸尘, 范代娣, 杨帆, et al. 人参皂苷化合物生物合成进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(1): 80-93.
Liu X C, Fan D D, Yang F, et al. Advances in biosynthesis of ginsenosides [J]. China Biotechnology, 2021, 41(1): 80-93.

[107] Wan L, Zhu Y, Zhang W, et al. Recent advances in design and application of synthetic membraneless organelles [J]. Biotechnology Advances, 2024, 73: 108355.

[108] Lyu X Y, Deng Y, Huang X Y, et al. CRISPR FISHer enables high-sensitivity imaging of nonrepetitive DNA in living cells through phase separation-mediated signal amplification [J]. Cell Research, 2022, 32(11): 969-981.

[109] Jerez L C, Weber W. Metabolite-responsive control of transcription by phase separation-based synthetic organelles [J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(3): 711-718.

[110] Sun Y, Lau S Y, Lim Z W, et al. Phase-separating peptides for direct cytosolic delivery and redox-activated release of macromolecular therapeutics [J]. Nature Chemistry, 2022, 14 (3): 274-283.

[111] Wen P A, Huang H, Zhang R, et al. Coacervate vesicles assembled by liquid-liquid phase separation improve delivery of biopharmaceuticals [J]. Nature Chemistry 2025, 17: 279 – 288

[112] Nandy M, Ghosh U, Ganar K A, et al. pH-tunable material

properties of glycine-rich condensates from tick bioadhesive [J]. Advanced Functional Materials, 2026, 36(10): e15418.

[113] Tiwari A, Bindal S, Bohidar H B. Kinetics of protein-protein complex coacervation and biphasic release of salbutamol sulfate from coacervate matrix [J]. Biomacromolecules, 2008, 10(1): 184-189.

[114] Hu X, Zhu H, Meng Q F, et al. Disrupting KAT8 liquid–liquid phase separation with hybrid vesicle–liposome platform for enhanced PD-L1 blockade treatment [J]. Advanced Materials, 2026, 38(25): e23584.

[115] Chuang H Y, He R Y, Huang Y A, et al. Engineered droplet-forming peptide as photocontrollable phase modulator for fused in sarcoma protein [J]. Nature Communications, 2024, 15 (1): 5686.

[116] Nosella M O, Tereshchenko M, Pritišanac I, et al. O-linked-N-acetylglucosaminylation of the RNA-binding protein EWS N-terminallow complexity region reduces phase separation and enhances condensate dynamics [J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(30): 11520–11534.

[117] Ji B T, Pan H T, Qian Z-G, et al. Programming biological communication between distinct membraneless compartments [J]. Nature Chemical Biology, 2025, 21(7): 1110-1117.





**通讯作者：**高宁（1991—），男，教授，博士生导师。2013年本科毕业于北京化工大学，2018年于清华大学获得化学博士学位，之后在英国布里斯托大学化学系从事博士后研究。2023年入职北京理工大学，研究方向包括人工细胞的设计与功能化、基于小分子液-液相分离的凝聚体系统等。

E-mail：gning@bit. edu. cn

**第一作者：**王运亭（1993—），女，博士后。研究方向为生物大分子液-液相分离的构筑及其在人工细胞中的应用。

E-mail：wyt15731113407@163. com

**作者贡献声明：**

高宁：提出概念、基本框架、提出研究方向、论文版本修订；王运亭：文献调研与整理、确定研究对象范围、收集数据、起草论文、修订论文

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

**利益冲突：**

本文作者声明不存在任何利益冲突。