

DOI:10.11784/tdxbz202504025

基于溶菌酶的大肠杆菌细胞裂解液优化制备 用于无细胞蛋白合成

韩雨泽¹, 杨影¹, 付催怡³, 鲍奕恺¹, 王梦凡^{1,2}

(1. 天津大学生命科学学院, 天津 300072; 2. 天津大学合成生物技术全国重点实验室, 天津 300072;
3. 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300350)

摘要: 无细胞蛋白合成(CFPS)系统因其操作便捷、快速合成蛋白和易于调控的优势, 已成为合成生物学研究中的有力平台工具。然而, 常规超声裂解法制备细胞裂解液的过程存在设备依赖性强、操作条件不可控、不利于工业放大、易造成裂解液机械或热失活等缺点。基于此, 本文提出了一种简单、温和的利用溶菌酶裂解细胞制备大肠杆菌 BL21 (DE3) 裂解液的方法, 并对制备过程中各关键条件和工艺进行了优化。即细胞培养过程中采用 0.5 mmol/L IPTG 诱导产生 T7 RNA 聚合酶, 溶菌酶裂解反应条件为 37.0 °C、pH 7.5、溶菌酶终浓度为 1.25 mg/mL; 细胞裂解后采用低速离心与振荡孵育相结合收集最终裂解液。蛋白质组学分析表明, 这一裂解液制备方法通过保留 γ -谷氨酰腐胺氧化还原酶(GGT)及核糖体相关蛋白, 有效维持了裂解液的氧化还原稳态及核糖体的翻译活性, 为后续 CFPS 反应提供了稳定的蛋白合成环境。CFPS 反应合成增强型绿色荧光蛋白(sfGFP)的结果表明, 在较广的 DNA 模板加入量(50~300 ng)下, 采用溶菌酶法制备的细胞裂解液能够达到与常规超声法相当的目标蛋白表达量。该策略为基于裂解液的 CFPS 系统的简便、可控、低成本构建提供了新方法, 有望应用于抗体、酶及其他功能性蛋白产品的体外合成和筛选。

关键词: 无细胞蛋白合成; 大肠杆菌裂解液; 溶菌酶; 响应面优化; 蛋白质组学分析

中图分类号: Q939 文献标志码: A 文章编号: 0493-2137(2026)05-0463-11

Lysozyme-Based *Escherichia coli* Cell Lysate: Optimized Preparation and Application in Cell-Free Protein Synthesis

Han Yuze¹, Yang Ying¹, Fu Cuiyi³, Bao Yikai¹, Wang Mengfan^{1,2}

(1. School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China;
2. State Key Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;
3. School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract: Cell-free protein synthesis (CFPS) systems are powerful platforms in synthetic biology, offering operational simplicity, rapid protein production, and tunable reaction conditions. However, the conventional sonication-based cell lysate method is limited by its reliance on specialized equipment, uncontrollable operational parameters, poor scalability, and potential mechanical or thermal inactivation of lysate components. To address these challenges, we developed a mild and streamlined protocol for preparing *Escherichia coli* BL21 (DE3) lysates using lysozyme-based lysis. The following key conditions and processes were systematically optimized: expression of T7 RNA polymerase was induced with 0.5 mmol/L IPTG during cell culture; lysate was conducted at 37.0 °C and pH 7.5 using 1.25 mg/mL (final concentration) lysozyme; after cell lysis, the final lysate was collected using a combination of low-speed centrifugation and oscillatory incubation. Proteomic analysis indicated that by preserving γ -

收稿日期: 2025-04-22; 修回日期: 2025-05-09.

作者简介: 韩雨泽(2000—), 女, 硕士, yuzeh@tju.edu.cn.

通信作者: 王梦凡, mwang@tju.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22178260); 天津市自然科学基金资助项目(24JCYBJC00070).

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 22178260), the Natural Science Foundation of Tianjin, China (No. 24JCYBJC00070).

glutamylputrescine oxidoreductase (GGT) and ribosome-associated proteins, this preparation method effectively maintained the redox homeostasis and ribosomal translational activity, which provided a stable protein synthesis environment for subsequent CFPS reactions. The results of CFPS reactions producing superfolder green fluorescent protein (sfGFP) showed that lysozyme-based lysates achieved target protein expression levels comparable to conventional sonication-based lysates across a wide range of DNA template concentrations (50—300 ng). This strategy provides a facile, controllable, and cost-effective alternative for constructing CFPS system, with broad potential for in vitro synthesis and screening of antibodies, enzymes, and other functional proteins.

Keywords: cell-free protein synthesis (CFPS); *Escherichia coli* lysate; lysozyme; response surface optimization; proteomic analysis

无细胞蛋白合成 (cell-free protein synthesis, CFPS) 系统作为合成生物学领域的有力工具, 在生物医药、生物传感和生物催化等领域展现出广泛的应用前景^[1-2]. 与传统活细胞蛋白表达系统相比, 这种去除了细胞壁限制的开放体系不仅能够高效表达具有细胞毒性的功能蛋白^[3-4], 还可通过实时调控反应环境实现非天然蛋白质的可控合成^[5]. 特别是基于大肠杆菌裂解液的无细胞系统, 因其遗传背景清晰、表达效率高且成本低廉, 已成为目前应用最广泛的 CFPS 平台^[6-7]. 细胞裂解液是该系统的核心, 直接决定着目标蛋白的产量和功能活性, 而裂解液中保留的完整转录翻译机制和丰富的酶类物质起着关键作用^[7].

近年来, 针对大肠杆菌细胞裂解液优化制备的研究持续深入. 传统超声波处理虽能快速裂解菌体释放胞内活性物质, 但存在诸多不可控因素. 首先, 超声仪器能量输入及装置操作难以实现标准化^[8]; 其次, 空化效应产生的强烈机械剪切力和局部高温, 易使生物分子变性失活, 丧失功能, 进而影响 CFPS 系统的效率; 此外, 超声对于少量样品或大规模样品的均匀制备仍存在限制. 近期, Piorino 等^[8]研究了不同超声能量输入对大肠杆菌裂解效果的影响, 结果表明, 常规标准化超声裂解存在局限性, 需根据具体表达模板特性优化裂解条件, CFPS 系统中超声能量具有复杂的条件依赖性. 为了克服超声法的缺陷, Joshi 等^[9]使用噬菌体 D29 溶菌酶结构域 (LD) 结合氯仿处理, 实现了大肠杆菌的高效快速裂解, 该方法释放的蛋白质 (如 GFP 和 RNA 聚合酶 α 亚基) 产量与超声裂解相当. Bednarska 等^[10]通过结合去污剂 (Triton X-100)、糖类 (蔗糖) 及螯合剂 (EDTA/EGTA), 实现了哺乳动物细胞全组分的高效保留与溶解. 化学试剂裂解法虽能提高裂解效率, 但可能面临试剂残留影响后续反应的难题.

溶菌酶是一种广泛存在于生物体内的天然酶类, 属于糖苷水解酶. 自 1922 年 Fleming 发现溶菌酶以来, 学术界已逐步阐明其通过特异性水解细菌细胞壁

肽聚糖 (peptidoglycan, PG), 实现细菌裂解的基本原理^[11]. 经典作用模式中, 溶菌酶展现出典型的 $\alpha + \beta$ 结构域特征: 其中 N 端结构域富含 α -螺旋, C 端则以 β -折叠为主^[12]. 这种特殊的空间构象不仅赋予其水解细菌细胞壁中 N-乙酰胞壁酸与 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1, 4-糖苷键的催化能力, 还能通过独立的蛋白结构域展现出直接杀菌活性, 形成了独特的“双功能抗菌机制”.

近年来, 溶菌酶逐渐被广泛应用于发酵工业中工程菌的破菌以获得目标蛋白或代谢产品. 例如, Levashov 等^[13]利用固定化的溶菌酶, 减少了氨基酸对裂解速率的干扰, 并发现外部扩散模式对裂解动力学的影响, 为连续化生产目标蛋白提供了新策略. Hsiang 等^[14]构建了基因工程菌株 L21, 通过调控 T7 溶菌酶 (LysY) 表达动态, 平衡了细胞裂解与毒性蛋白生产的能量消耗, 显著提高了毒性蛋白的产量与稳定性. Castro 等^[15]开发了 18 °C 诱导的溶菌酶 WxL 表达系统, 揭示了 WxL 在嗜冷细菌裂解中的作用, 为低温破菌和目标蛋白提取提供了新方法. 由此可见, 对于 CFPS 体系, 利用溶菌酶进行细胞裂解, 有望解决常规超声法存在的设备依赖性高、机械或热损伤不可控、不利于大量制备的问题. 然而, 溶菌酶在发酵工业中的应用目的与面向 CFPS 系统的裂解液制备存在显著差异: 前者旨在通过完全裂解细胞释放胞内蛋白或代谢产物, 常需辅以高强度离心或化学试剂彻底清除细胞碎片; 而后者则需在温和裂解过程中选择性保留核糖体复合物、翻译因子及能量代谢酶系等活性组分, 以维持后续 CFPS 反应中转录翻译机器的完整性.

因此, 本文提出了面向 CFPS 应用体系的溶菌酶裂解制备大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞裂解液的方法, 并使用增强型绿色荧光蛋白 (sfGFP) 为报告蛋白, 构建 CFPS 表达体系予以验证. 为了尽可能保持裂解液的体外转录翻译活性, 对裂解液制备过程各环节 (细胞培养、细胞裂解及裂解液收集) 中的关键影响因素

进行了优化,包括 T7 RNA 聚合酶(T7 RNAP)诱导剂的浓度、溶菌酶裂解反应条件以及裂解液的后处理方式. 研究中结合蛋白质组学分析了裂解后处理方式对收集的裂解液有效成分的影响. 最后,通过在

CFPS 反应中加入梯度浓度的报告蛋白 DNA 模板,对比了常规超声法与该溶菌酶裂解策略的 CFPS 应用效果(图 1).

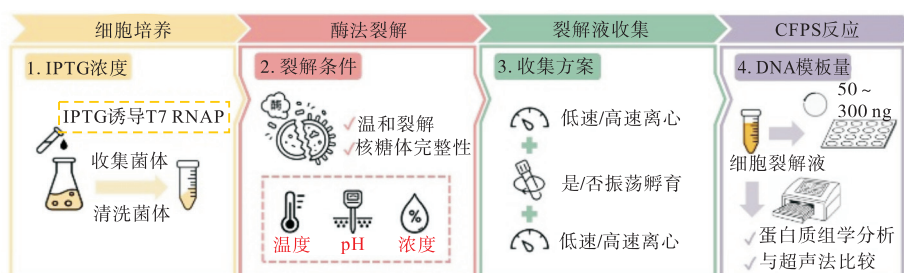


图 1 基于溶菌酶的细胞裂解液优化制备用于无细胞蛋白合成

Fig.1 Optimized preparation of lysozyme-based cell lysate for cell-free protein synthesis

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株为实验室保存. 用于目的蛋白表达质粒 pJL1-sfGFP, 购自上海派泊生物科技有限公司; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 购自上海 BBI 公司; 溶菌酶、谷氨酸镁、谷氨酸钾、碳酸氢铵 (NH_4HCO_3)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA) 和尿素, 购自美国 Sigma 公司; 甲酸 (FA), 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 测序级改性胰蛋白酶, 购自美国 Promega 公司; 乙腈 (ACN), 购自美国 Merck 公司.

1.2 溶菌酶法制备细胞裂解液

将大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株的甘油菌过夜活化, 以 0.1% 的比例转接到 1 L $2 \times \text{YTP}$ 培养基中. 在 37.0°C 、250 r/min 下培养至 $\text{OD}_{600} = 0.6 \sim 0.7$, 随后加入一定浓度的 IPTG 来诱导 T7 RNAP 的表达. 当培养物的 $\text{OD}_{600} \approx 3$ 时, 于 4°C 、5 000g 离心 10 min 收获细胞. 用预冷的 S30 缓冲液 (14 mmol/L 谷氨酸镁, 60 mmol/L 谷氨酸钾, 50 mmol/L Tris-乙酸, pH 7.7) 于 4°C 、5 600g 离心 10 min 洗涤菌体 3 次. 将洗涤后的菌体置于 -80°C 冰箱中过夜冷冻. 将过夜冷冻后的菌体置于 37.0°C 水浴中化冻, 每 1 g 菌体加入 1 mL 一定 pH 值的 S30 裂解缓冲液, 重悬菌体. 加入一定体积已配制好的 100 mg/mL 溶菌酶溶液储备液进行破菌, 冰浴 30 min 后, 在一定温度下水浴裂解反应 10 min, 再次冰浴 30 min. 随后, 经后处理步骤收集细胞裂解液.

1.3 补充溶液配制

补充溶液中包含以下组分: 10 mmol/L 谷氨酸

铵、175 mmol/L 谷氨酸钾、2.7 mmol/L 水合草酸钾、20 mmol/L 亚精胺、0.67 mol/L 磷酸烯酰丙酮酸盐、5 mmol/L 谷氨酸镁、200 g/L PEG8000、1.2 mmol/L 亚叶酸、6.6 mmol/L NAD、30 mmol/L ATP、18 mmol/L CTP、30 mmol/L GTP、18 mmol/L UTP、5.4 mmol/L CoA、4 mg/mL tRNA、15 mmol/L cAMP. 氨基酸的浓度均为 50 mmol/L, 涵盖 19 种氨基酸 (谷氨酸以谷氨酸盐的形式添加), 包括精氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等.

1.4 CFPS 反应及 sfGFP 蛋白表达定量

每个 CFPS 反应体系包含 $4\ \mu\text{L}$ 细胞裂解液, $6.75\ \mu\text{L}$ 上述补充溶液, 以及 200 ng 目标蛋白表达模板 (文中使用 pJL1-sfGFP 质粒作为 DNA 模板). 最终体系通过无酶水定容至 $15\ \mu\text{L}$.

CFPS 反应在黑色 384 微孔板中进行, 在荧光酶标仪 (Feyond-F100, ALLSHENG) 中 37.0°C 反应 12 h, 在 485 nm 激发光下测定 530 nm 的荧光发射光强度. 通过荧光强度与 sfGFP 蛋白浓度之间的标准曲线, 确定 CFPS 反应生成的 sfGFP 蛋白表达量.

1.5 蛋白质组学分析

取一定体积的细胞裂解液 (总蛋白含量 $500\ \mu\text{g}$) 于 1.5 mL 离心管中, 用 8 mol/L 尿素溶液调至最终体积为 $300\ \mu\text{L}$. 加入 $15\ \mu\text{L}$ 200 mmol/L DTT, 终浓度为 10 mmol/L, 室温孵育 45 min. 随后, 加入 $12\ \mu\text{L}$ 1 mol/L IAA 至终浓度为 40 mmol/L, 室温避光孵育 45 min. 将样本转移至 0.5 mL 的 10 kDa 超滤管中, 加入 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液将溶液体积补充至约 $350\ \mu\text{L}$, 室温 14 000g 离心 30 min, 弃滤液, 再分 3 次向超滤管中加入 $350\ \mu\text{L}$ 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 14 000g 离心 30 min. 向超滤管中加 $30\ \mu\text{L}$ 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 加 $2\ \mu\text{g}$ 胰酶, 吹吸混匀蛋白溶液, 接收管放 $200\ \mu\text{L}$ 超纯水保持湿润, 37.0°C 孵育消化

12~14 h. 更换新接收管, 用纸擦干 10 kDa 超滤管外壁, 14 000 g 下离心 30 min; 超滤管中加 50 μ L 超纯水混匀, 室温 14 000g 离心 30 min, 收集肽段, 重复 1 次. 使用 C18 柱除盐, 达到浓缩蛋白质的目的^[16-17].

样品使用液相色谱(EASY-nLC1200, Thermo)-质谱(Q ExactiveTM HF, Thermo)进行分析. 采用单色谱柱模式, 分析柱的填料内径是 1.9 μ m, 柱长是 20 cm, 内径为 75 μ m. 流动相中 A 相为 0.1% FA, B 相为 80% ACN + 0.1% FA. 单个样品检测的洗脱梯度是 5%~95%, 洗脱时间是 1~75 min, 总梯度时长是 75 min, 质谱检测相关参数设置如下: 离子传输管温度为 320 $^{\circ}$ C, 一级分辨率为 120 000, 自动增益控制(automatic gain control, AGC)为 3.0×10^6 , 最大离子注入时间是 80 ms, 扫描范围为 300~1 400 m/z ; 二级分辨率为 15 000, 最大离子注入时间为 22 ms, 扫描范围 200~2 000 m/z , AGC 为 2.0×10^4 .

1.6 中心复合设计实验

本研究采用中心复合设计(central composite design, CCD), 以 sfGFP 的表达量为响应值, 对温度(自变量 X_1)、溶菌酶浓度(自变量 X_2)和 pH(自变量 X_3)进行 3 因素 5 水平优化实验. 通过 Design-Expert 软件对实验数据拟合. 实验设计如表 1 所示.

表 1 CCD 实验设计数值

Tab.1 Central composite design experimental parameters

水平	因素		
	$X_1/^{\circ}$ C	X_2 /(mg/mL)	X_3
-2	36.0	0.25	6.5
-1	36.5	0.75	7.0
0	37.0	1.25	7.5
1	37.5	1.75	8.0
2	38.0	2.25	8.5

1.7 显微镜观察

对于未经裂解的大肠杆菌细胞, 用 PBS 缓冲液进行稀释后, 使用革兰氏染色试剂盒(环凯, 中国广东)进行染色, 随后在显微镜(BA410E, Motic)下进行观察, 使用 DigiLab3 软件进行图片采集. 对于经超声法或溶菌酶法裂解后的大肠杆菌细胞, 用 PBS 缓冲液将裂解后的样品稀释同样倍数, 后续操作同未裂解组.

本研究中全部实验均重复 4 次, 结果为平均值.

2 结果讨论

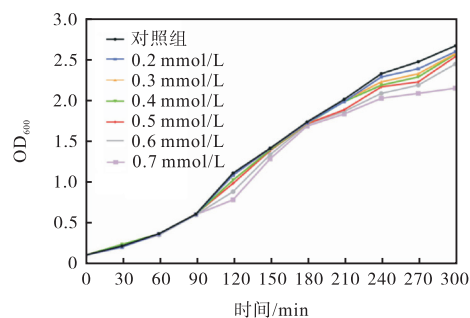
2.1 细胞培养中 IPTG 诱导条件优化

制备高质量大肠杆菌细胞裂解液需要以细胞培养为基础. 本研究采用 BL21(DE3) 菌株, 其基因组

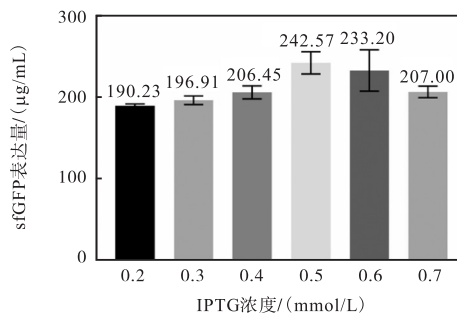
中整合了受 lacUV5 启动子调控的 T7 RNAP 编码基因. 在 IPTG 诱导下, T7 RNAP 被特异性表达, 进而识别并激活表达载体中的 T7 启动子, 驱动下游外源基因的高效转录. 相较于传统表达系统, T7 表达系统具有显著优势: 其一, 其转录效率可达大肠杆菌内源性 RNA 聚合酶的(5~8)倍, 能显著提升外源基因表达水平; 其二, 通过 lac 操纵子系统实现严谨调控, 可有效避免外源蛋白过早表达对宿主细胞的毒性作用.

在 T7 表达系统中, T7 RNAP 的表达水平是决定系统效率的核心参数. 过量的酶分子可能引发代谢负荷过载, 导致质粒不稳定和包涵体形成; 而若 T7 RNAP 的量不足则无法充分启动下游基因转录. 这种平衡关系受多重因素调控, 包括诱导时机、宿主菌翻译能力、培养条件等, 其中 IPTG 诱导浓度作为直接调控 T7 RNAP 表达的关键变量, 其优化选择对系统性能具有决定性影响. 本实验通过设置 0.2~0.7 mmol/L 梯度浓度, 系统探究了 IPTG 浓度对 T7 RNAP 表达量及 CFPS 目标蛋白产量的影响规律.

如图 2(a) 所示, 诱导浓度也会影响细胞生长, 0.2~0.5 mmol/L 组的 OD₆₀₀ 在诱导后收到轻微抑制, 而 0.6、0.7 mmol/L 两组的抑制效果增强, 表明过高的酶量可能导致能量代谢的失衡. 进一步分析发现, sfGFP 蛋白表达量呈现先升高后降低的趋势(图



(a) IPTG 浓度对 OD₆₀₀ 的影响



(b) IPTG 浓度对 sfGFP 表达量的影响

图 2 诱导条件对细胞生长和 sfGFP 表达量的影响
Fig.2 Effects of induction condition on cell density and expression yield of sfGFP

2(b)), 其中 0.5 mmol/L IPTG 诱导的实验组获得最大 sfGFP 目标蛋白产量, 优于其他实验组. 这一现象可通过酶动力学平衡理论解释: 适量浓度的 IPTG 诱导产生最佳剂量的 T7 RNAP, 既保证充分激活 T7 启动子驱动目标基因高效转录, 又避免过量酶分子竞争核糖体结合位点导致翻译抑制. 而当 IPTG 浓度超过 0.6 mmol/L 时, 代谢副产物积累引发氧化应激反应, 导致分子伴侣合成受阻, 错误折叠蛋白比例显著升高.

综上, 这里选择 0.5 mmol/L IPTG 为大肠杆菌细胞培养中最佳诱导浓度, 该条件通过精准调控 T7 RNAP 表达量, 在实现提高转录效率的同时, 也降低代谢负荷, 成功达成了两者的协同优化, 从而保障了后续裂解液能够高效地用于 CFPS 反应以表达目标蛋白.

2.2 溶菌酶裂解反应条件优化

溶菌酶对 β -1, 4-糖苷键具有水解专一性, 这种糖苷键主要存在于细菌细胞壁的肽聚糖结构中, 因此溶菌酶可以特异性地破坏细胞壁, 实现细胞裂解, 而不会对细胞内其他转录翻译元件的功能造成影响, 而且溶菌酶也不会参与到转录翻译过程中的化学反应. 因此, 相对于超声或化学处理, 溶菌酶是一种温和的破菌剂.

通常温度、pH、酶的浓度是影响酶促反应的 3 个主要因素, 本研究以这 3 个因素为自变量, 以 CFPS 反应产生 sfGFP 蛋白表达量为响应值, 设计了 3 因素 5 水平 CCD 实验, 结果如表 2 所示.

表 2 CCD 实验结果

Tab.2 Results of CCD experiments

编号	$X_1/^\circ\text{C}$	$X_2/(\text{mg/mL})$	X_3	sfGFP 表达量/ $(\mu\text{g/mL})$
1	37.5	0.75	8.0	763.5 ± 5.3
2	37.0	1.25	7.5	773.3 ± 10.1
3	36.5	1.75	8.0	762.8 ± 4.2
4	37.0	2.25	7.5	760.2 ± 2.3
5	37.0	1.25	8.5	759.7 ± 8.4
6	37.0	1.25	6.5	760.8 ± 9.3
7	37.5	1.75	7.0	764.0 ± 6.2
8	37.0	1.25	7.5	773.0 ± 2.1
9	37.0	1.25	7.5	773.5 ± 2.1
10	37.5	0.75	7.0	763.1 ± 3.3
11	36.0	1.25	7.5	760.5 ± 12.4
12	37.0	1.25	7.5	773.2 ± 3.1
13	36.5	0.75	7.0	763.6 ± 5.2
14	37.0	1.25	7.5	773.0 ± 2.1
15	37.0	1.25	7.5	773.3 ± 3.1
16	37.0	0.25	7.5	760.1 ± 5.5
17	36.5	0.75	8.0	763.3 ± 12.2
18	37.5	1.75	8.0	762.5 ± 8.3
19	38.0	1.25	7.5	759.9 ± 9.5
20	36.5	1.75	7.0	763.8 ± 7.2

通过 CCD 模型得到二次回归方程为

$$Y = 773.19 - 0.1X_1 - 0.0125X_2 - 0.2875X_3 + 0.025X_1X_2 + 0.0025X_1X_3 - 0.325X_2X_3 - 3.27X_1^2 - 3.28X_2^2 - 3.25X_3^2$$

响应面二次模型方差分析见表 3, 相关系数 $R^2 = 0.9991$, 说明模型对实际情况拟合较好; $p < 0.05$ 表示模型拟合显著, 本实验中 $p = 0.0021$, 说明模型高度显著.

表 3 CCD 二次模型分析

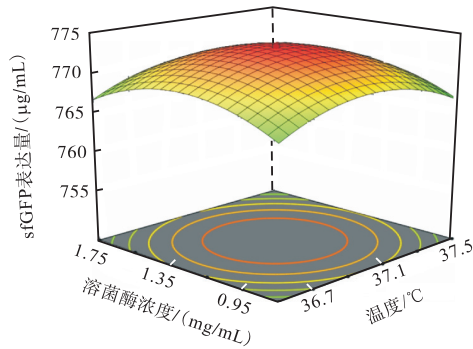
Tab.3 Quadratic model analysis of CCD

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p	显著性
模型	565.52	9	62.84	1 241.48	< 0.000 1	极显著
X_1	0.16	1	0.16	3.16	0.105 8	不显著
X_2	0.002 5	1	0.002 5	0.049 4	0.828 6	不显著
X_3	1.32	1	1.32	26.13	0.000 5	不显著
X_1X_2	0.005	1	0.005	0.098 8	0.759 7	不显著
X_1X_3	0.005	1	0.005	0.098 8	0.759 7	不显著
X_2X_3	0.845	1	0.845	16.7	0.002 2	不显著
X_1^2	268.18	1	268.18	5 298.53	< 0.000 1	极显著
X_2^2	270.23	1	270.23	5 339.17	< 0.000 1	极显著
X_3^2	266.13	1	266.13	5 258.05	< 0.000 1	极显著
残差	0.506 1	10	0.050 6			
失拟	0.317 8	5	0.063 6	1.69	0.289 9	不显著
纯误差	0.188 3	5	0.037 7			
总离差	566.03	19				

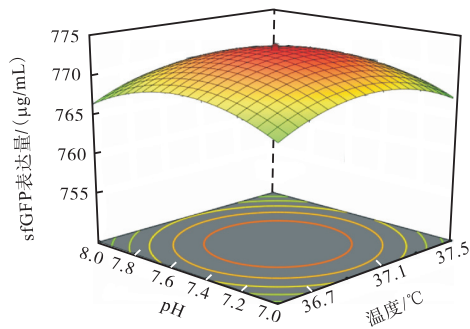
图 3 为响应面 3D 分析图, 由此可直观确定任意两因素交互作用对目的蛋白表达量的影响, 并确定各因素的最佳水平. 图 3(a) 显示了 pH 值在 7.5 的条件

下, 温度和溶菌酶浓度对目的蛋白表达量的交互影响. 整体上, 随着溶菌酶浓度的增加以及温度的升高, sfGFP 表达量呈现出先上升后下降的趋势, 当温

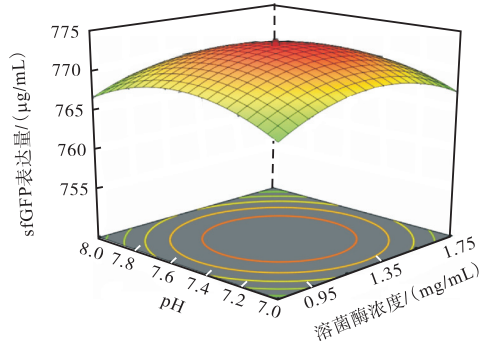
度为 37.0 °C、溶菌酶终浓度为 1.25 mg/mL 时两个因素交互效应最显著。



(a) 温度与溶菌酶浓度交互变化对 sfGFP 表达量的影响



(b) 温度与 pH 交互变化对 sfGFP 表达量的影响



(c) pH 与溶菌酶浓度交互变化对 sfGFP 表达量的影响

图 3 响应面 3D 分析图

Fig.3 3D response surface analysis plot

图 3(b) 显示了溶菌酶终浓度为 1.25 mg/mL 时, 温度和 pH 对目的蛋白表达量的交互影响. 在实验水平范围内, sfGFP 目的蛋白表达量随两者增大先升高后降低. 当温度为 37.0 °C、pH 值为 7.5 时两个因素的交互效应最显著。

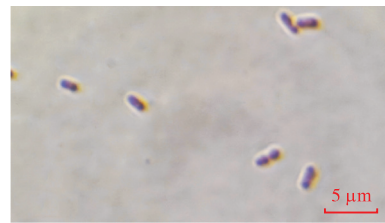
图 3(c) 显示了当温度为 37.0 °C 时, pH 和溶菌酶浓度对目的蛋白表达量的交互影响. 在实验水平范围内, pH 和溶菌酶浓度交互影响显著, 目的蛋白表达量随两者增大先升高后降低。

由此确定了使用溶菌酶法制备细胞裂解液时, 最佳裂解条件为: 在每 1 g 菌体中加入 1 mL pH 7.5 的

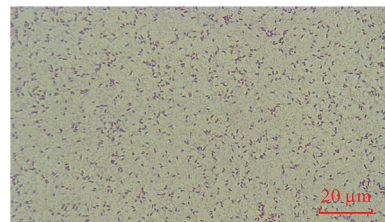
S30 裂解缓冲液, 重悬菌体; 加入溶菌酶溶液储备液至终浓度为 1.25 mg/mL 以进行细胞裂解, 先冰浴 30 min, 随后在 37.0 °C 下水浴 10 min, 再次冰浴 30 min, 经后处理收集裂解液; 随后, 在 CFPS 反应中, 利用该溶菌酶处理制备的裂解液合成 sfGFP 蛋白表达量可达 773.49 µg/mL。

2.3 裂解后处理方式的优化

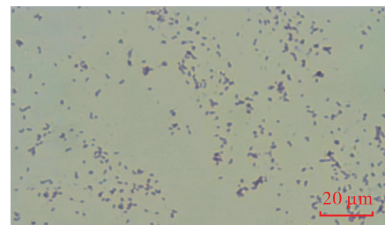
利用显微镜对常规超声和溶菌酶法裂解后大肠杆菌细胞的形态进行观察, 如图 4 所示. 未裂解前大肠杆菌呈现短棒状(图 4(a)), 经超声法(图 4(b))和溶菌酶法(图 4(c))处理后都未发现完整的细胞形态, 证明了两种方法均可实现细胞的完全裂解. 超声法细胞的破碎程度远超溶菌酶法, 碎片尺寸更小. 这暗示了溶菌酶在裂解细胞的过程中更加温和, 有利于保证裂解液中物质的活性, 且更易于通过离心的方法去除细胞碎片。



(a) 未经裂解的大肠杆菌显微镜下的形态



(b) 超声法裂解的大肠杆菌显微镜下的形态



(c) 溶菌酶法裂解的大肠杆菌显微镜下的形态

图 4 两种不同的裂解方法对大肠杆菌细胞形态的影响

Fig.4 Effects of two distinct lysis methods on *E. coli* cellular morphology

传统细胞裂解液的后处理工艺通常与物理(如超声破碎)或化学(如去污剂处理)裂解方法相适配, 其核心目标是通过离心、振荡孵育等步骤实现碎片清除与功能组分的最大化保留. 然而, 本研究提出的溶菌

酶裂解法作为一种生物酶解策略,其作用机制与物理或化学裂解存在显著差异:溶菌酶通过特异性水解肽聚糖层实现温和裂解,避免了高能量输入或化学试剂对核糖体及代谢酶系的损伤。因此,针对该方法的特性,需对裂解后处理步骤进行优化,以尽可能保留细胞裂解液中的有效成分,进而提高 CFPS 反应中目的蛋白的表达量。

高速离心(29 800g)虽能高效去除细胞膜碎片及核酸聚集物,但可能同步损失核糖体复合物(70S)及分子伴侣等大分子。低速离心(18 000g)虽保留更多胞内组分,却因碎片残留引发背景干扰。此外,37.0 °C 振荡孵育处理可通过激活内源性蛋白酶降解宿主蛋白,但同时可能破坏转录因子(如 $\sigma 70$)的构象稳定性。因此,本研究考察了溶菌酶裂解大肠杆菌细胞后的3种后处理方案。后处理组1为溶菌酶裂解细胞后,于4 °C、29 800g离心30 min两次;后处理组2为溶菌酶裂解细胞后,于4 °C、18 000g离心30 min,再经37.0 °C、200 r/min振荡孵育1 h,最后于4 °C、10 000g离心10 min;后处理组3为溶菌酶裂解细胞后,于4 °C、29 800g离心30 min,再经37.0 °C、200 r/min振荡孵育1 h,最后于4 °C、10 000g离心10 min。分别利用这3种方法处理后,收集上清液,以此作为 CFPS 反应中的细胞裂解液,测定其体外合成 sfGFP 蛋白的能力。

如图5所示,后处理组2获得了最高的 sfGFP 蛋白表达量(773.25 ± 21.17) μg/mL。作为对照,常规超声处理法(超声输出功率 50 W,开 2 s、关 3 s,共 40 min 裂解细胞后,于4 °C、29 800g离心30 min两次)收集得到的裂解液在 CFPS 反应中生成 sfGFP 的表达量为(738.80 ± 20.46) μg/mL。由此可见,虽然不同处理方法所得裂解液中总蛋白浓度基本相同,但溶菌酶裂解结合后处理组2方案获得的大肠杆菌裂解

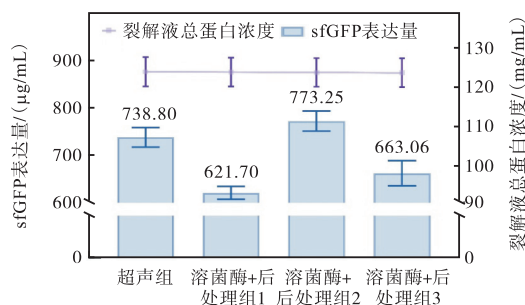


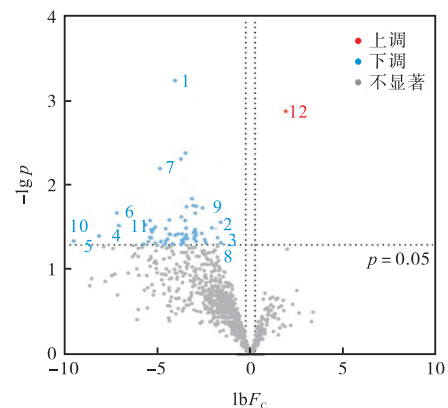
图5 实验组与超声组的表达量与裂解液总蛋白浓度比较

Fig.5 Comparison of expression levels and total protein concentrations in the lysate between the experimental and sonication groups

液,其 CFPS 反应能力较常规超声法有所提高,而溶菌酶裂解结合后处理组1和溶菌酶裂解结合后处理组3方案,较超声组表达量分别下降了15.85%和10.25%。

针对上述不同后处理方法收集的裂解液在 CFPS 反应中表现出的 sfGFP 合成能力的差异,这里利用蛋白质组学分析来探究其原因。

如图6所示,溶菌酶裂解结合后处理组1中采用的两次高速离心,显著降低了与核糖体功能及能量代谢相关的关键蛋白含量,直接削弱了无细胞系统的翻译能力。图6横坐标 F_C 为差异倍数。首先,核糖体相关蛋白如 P32176|FDOG_ECOLI(核糖体成熟因子)和 P24255|RP54_ECOLI(核糖体小亚基蛋白 S4)的下调尤为突出。溶菌酶作用导致核糖体亚基解离。两次高速离心(29 800g)则将这些碎片或未释放的完整核糖体沉淀为细胞碎片,导致裂解液中核糖体蛋白含量不足。核糖体是翻译的核心组件,其缺失直接导致 mRNA 无法有效加载到核糖体上,翻译起始和延伸过程均受阻^[18],这是实验组目的蛋白产量显著低于对照组的主要原因。



- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1—P32176 FDOG_ECOLI; | 7—P0AGB6 RPOE_PCOLI; |
| 2—P24255 RP54_ECOLI; | 8—P0A8Y1 YJGG_ECOLI; |
| 3—P07014 SDHB_ECOLI; | 9—P0AG27 YIBN_ECOLI; |
| 4—P0AFC3 NUOA_ECOLI; | 10—P0A742 MSCL_ECOLI; |
| 5—P0AEE1 DCQB_ECOLI; | 11—P0A912 PAL_ECOLI; |
| 6—P0C054 IBPA_ECOLI; | 12—P0ADE6 KBP_ECOLI; |

图6 溶菌酶结合后处理组1与超声组的蛋白差异火山图

Fig.6 Volcano plot of differential protein expression analysis between the lysozyme + post-treatment 1 group and the sonication group

其次,能量代谢相关酶类如 P07014|SDHB_ECOLI(琥珀酸脱氢酶)、P0AFC3|NUOA_ECOLI(NADH 脱氢酶)和 P0AEE1|DCQB_ECOLI(泛醌氧化酶)的显著下调进一步加剧了翻译效率的降低。这些酶类参与呼吸链电子传递和 ATP 合成,其构象破坏或失活会直接导致 ATP 生成减少^[19-20]。高速离心

步骤去除了线粒体碎片及膜结合酶类,使得裂解液中能量代谢酶含量不足. ATP 是翻译延伸、tRNA 加载及核糖体移动的关键驱动力,能量供应不足会显著延长翻译周期,甚至导致翻译中途停滞,最终限制目的蛋白的累积速率.

除核糖体与能量系统的直接损伤外,应激响应相关蛋白和翻译辅助因子的下调进一步放大了实验组无细胞系统的功能缺陷. 例如,热休克蛋白 P0C054|IBPA_ECOLI(分子伴侣)和 σ 因子 P0AGB6|RPOE_ECOLI(调控应激基因表达)的显著减少,表明溶菌酶的裂解方式破坏了细胞应激保护机制. IbpA 通过协助蛋白折叠和修复错误构象维持翻译产物的稳定性,其缺失可能导致新合成蛋白的聚集或降解^[21]; RpoE 的丢失则削弱了系统对翻译环境压力(如错误折叠蛋白积累)的响应能力. 此外,翻译辅助因子如 P0A8Y1|YJG_ECOLI(翻译调控蛋白)和 P0AG27|YIBN_ECOLI(参与核糖体组装)的下调,可能源于溶菌酶对低分子质量蛋白的降解作用或离心导致的流失. 这些因子的不足会延长核糖体组装时间,降低翻译起始效率,进一步拖慢整体蛋白合成进程.

同时,细胞膜相关蛋白如 P0A742|MSCL_ECOLI(机械敏感通道蛋白)和 P0A912|PAL_ECOLI(肽聚糖结合蛋白)的完全去除,反映了高速离心对疏水组分的过度清除. 尽管膜碎片残留可能干扰反应体系的均一性,但完全去除膜蛋白可能导致脂质微环境缺失,影响某些膜依赖的翻译因子的功能.

在广泛下调的背景下, P0ADE6|KBP_ECOLI(激酶结合蛋白)的异常上调成为实验组的显著特征. 这一现象可能与溶菌酶引发的细胞应激响应有关. 物理化学裂解的过程激活了细菌的 SOS 响应通路,诱导 KBP 表达以调控激酶活性或维持代谢稳态. KBP 可能通过磷酸化修饰影响能量分配或修复部分损伤,但其单一上调无法弥补核糖体、代谢酶及辅助因子的系统性缺失. 此外, KBP 的功能尚不明确,其过度表达可能占用有限的 ATP 资源,或通过负反馈抑制其他关键通路,反而加剧翻译系统的低效率.

如图 7 所示,后处理组 2 采用的溶菌酶结合低速离心和振荡孵育的裂解方法,通过温和的物理处理策略,显著保留了细胞膜相关酶类的活性,这是 P37906|PUUB_ECOLI(γ -谷氨酰腐胺氧化还原酶, GGT)在实验组中唯一上调的核心原因. GGT 是一种位于大肠杆菌外膜的关键酶,其功能依赖完整的膜结构^[22]. 溶菌酶的裂解作用避免了超声法对细胞膜的剧烈机械破坏,使外膜蛋白(包括 GGT)的构象得以

保留;溶菌酶特异性降解细胞壁肽聚糖,进一步释放膜结合酶类而不损伤其活性. 此外,实验组低速离心(18 000g 和 10 000g)仅去除大颗粒碎片(如未裂解细胞和细胞壁残骸),避免高速离心(29 800g)对低密度膜蛋白或外膜囊泡的过度去除. 后续的 37.0 °C 振荡孵育 1 h 则可能通过温度依赖的酶活化机制,促进 GGT 的构象恢复或增强其催化活性. 相比之下,对照组的超声裂解结合高速离心可能直接破坏膜结构并清除外膜组分,导致 GGT 在裂解液中含量降低. 这一差异表明,实验组(后处理组 2)的裂解策略在保留膜相关功能蛋白方面具有显著优势,为 GGT 的上调提供了必要条件.

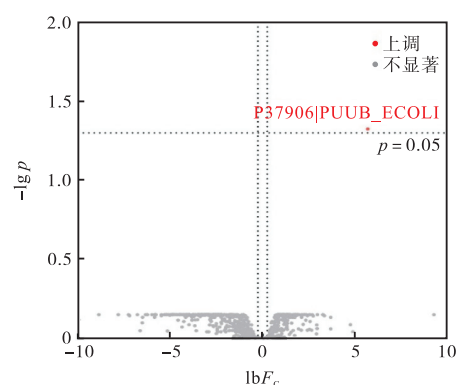


图 7 溶菌酶结合后处理组 2 与超声组的蛋白差异火山图
Fig.7 Volcano plot of differential protein expression analysis between the lysozyme + post-treatment 2 group and the sonication group

GGT 的上调对无细胞反应中目的蛋白产量的维持(实验组 700.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 对照组 702.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)具有多重生物学意义,核心在于其通过调控谷胱甘肽(GSH)代谢维持氧化还原稳态,并支持蛋白质生物合成所需的半胱氨酸供应. 首先,GGT 通过水解细胞外 GSH 生成谷氨酸和半胱氨酰甘氨酸(后者进一步分解为半胱氨酸和甘氨酸),为细胞内 GSH 的再生提供原料. GSH 作为主要抗氧化剂,能够清除无细胞反应中产生的活性氧(ROS),保护核糖体、翻译因子及新合成蛋白免受氧化损伤. 实验组中 GGT 的活性保留可能显著降低氧化应激对翻译系统的干扰,避免因蛋白错误折叠或酶失活导致的产量下降. 其次,半胱氨酸不仅是 GSH 合成的必需前体,也是多种蛋白质(尤其是含硫氨基酸的酶类)生物合成的关键底物. GGT 介导的细胞外 GSH 分解可高效补充半胱氨酸库,支持 tRNA 加载和翻译延伸过程. 在无细胞反应中,半胱氨酸的充足供应可能加速肽链延伸速率,从而提升整体蛋白合成效率. 此外, GSH 的再生需消耗 ATP,而 GGT 的活性可能通过维持 GSH/氧化型谷胱甘肽

(GSSG)平衡,间接稳定细胞内 ATP 水平. 半胱氨酸还可通过参与硫代谢通路生成辅酶 A 等分子,进一步支持能量代谢与翻译相关酶的活性^[23]. 这些机制共同作用,使实验组裂解液在核糖体含量或离心损失等其他潜在劣势下,仍能通过 GGT 的功能补偿,实现与对照组相近的目的蛋白产量.

综上,后处理组 2 中采用的溶菌酶+低速离心-振荡孵育-低速离心的后处理策略,通过保留关键膜蛋白(如 GGT)并优化氧化还原环境,成功实现了与超声裂解对照组相当的蛋白产量,凸显了其在功能性组分保留与系统稳定性方面的独特优势. 温和裂解避免了外膜蛋白的破坏,低速离心减少了对膜囊泡的清除,使 GGT 等依赖膜结构的酶类得以保留. 此类酶在传统裂解方法中常被忽视,但其对代谢网络的支持可能是实验组性能平衡的关键. 同时,GGT 通过 GSH 代谢维持的抗氧化能力,为无细胞反应提供了“缓冲机制”,减少了 ROS 对翻译机器的累积损伤. 这一特性在长时间反应或高负载表达场景中可能更具优势. 半胱氨酸的持续供应不仅支持蛋白质合成,还可能通过硫代谢通路激活其他辅助因子(如辅酶 A),形成多层次的代谢支持网络. 尽管实验组在核糖体回收或碎片去除效率上可能存在局限,但功能性组分的协同作用有效抵消了这些缺陷.

如图 8 所示,后处理组 3 采用的溶菌酶结合高速离心和振荡孵育的裂解后处理方法,虽然通过温和的物理裂解策略部分保留了膜结合蛋白和应激调控因子,但其核心缺陷在于对转录翻译相关功能组分的系统性破坏,最终导致实验组目的蛋白产量(577.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)显著低于对照组(702.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 溶

菌酶的作用过程激活了细菌的应激响应通路,诱导了如 P0AGB6|RPOE_ECOLI(σ 因子 E)和 P0AFX4|RSD_ECOLI(σ 因子调控蛋白)等应激相关蛋白的上调. 这些蛋白通过修复膜损伤或平衡资源分配帮助细菌应对裂解压力,但其同时也消耗了大量 ATP 和氨基酸资源,挤占了翻译系统的核心需求. 此外,实验组的一次高速离心(29 800g)虽去除了大颗粒碎片,却未能有效保留核糖体、代谢酶等低密度组分,而后续的低速离心(10 000g)进一步加剧了可溶性功能蛋白的流失. 尽管部分膜结合蛋白(如 P56258|WECF_ECOLI)因疏水性未被完全清除,但其功能多集中于底物转运或应激保护,与翻译机器的直接关联有限,甚至可能因膜碎片残留干扰反应体系的均一性. 因此,实验组的上调蛋白虽在短期内维持了细胞稳态,却未能弥补功能性组分的缺失,反而因资源竞争加剧了翻译效率的下降.

P0A6J5|DADA_ECOLI(天冬氨酸脱羧酶)、P31057|PANB_ECOLI(泛酸合成酶)和 P75829|YBJX_ECOLI(膜结合转运蛋白)等关键蛋白的显著下调,直接反映了裂解方法对翻译核心网络的破坏. 溶菌酶作用过程可能导致核糖体亚基(如 RPOC_ECOLI)和 RNA 聚合酶组分的释放不完全,而高速离心进一步去除了未结合的核糖体碎片和可溶性代谢酶. 例如,DADA_ECOLI 的缺失导致天冬氨酸代谢受阻,限制了蛋白质合成所需的底物供应;PANB_ECOLI 的下调则减少了辅酶 A 的生成,影响乙酰化修饰和能量代谢效率. 同时,线粒体相关蛋白(如 YBJX_ECOLI)的减少表明能量代谢网络被切断,ATP 和 NADH 的供应不足直接削弱了翻译延伸的驱动力,导致核糖体移动速率下降甚至停滞. 此外,脱氧核苷酸酶(DEOD_ECOLI)和异柠檬酸脱氢酶(IDND_ECOLI)的流失进一步限制了核苷酸前体的供应和能量代谢通量^[24-25],形成恶性循环. 这些下调蛋白的集体缺失瓦解了无细胞反应的三大支柱,即转录模板生成、能量供应和底物代谢,最终导致实验组翻译能力的全面衰退.

后处理组 3 中的裂解液制备方法的系统性缺陷在于功能性组分的过度丢失与应激响应的资源冲突. 尽管应激蛋白(如 RPOE_ECOLI)的上调通过修复膜损伤或调控基因表达提供了一定保护,但其高能耗特性加剧了 ATP 和辅因子的短缺. 与此同时,高速离心在去除细胞碎片的过程中,将未释放的核糖体、线粒体酶及可溶性辅因子一并清除,导致翻译机器大大减少. 膜蛋白的残留虽可能提供局部微环境支持,

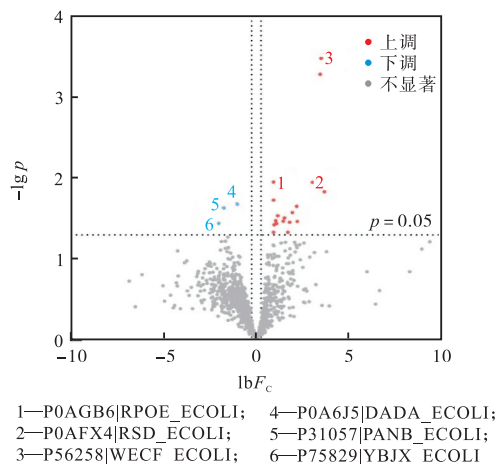


图 8 溶菌酶结合后处理组 3 与超声组的蛋白差异火山图
Fig.8 Volcano plot of differential protein expression analysis between the lysozyme + post-treatment 3 group and the sonication group

但碎片过多会干扰反应均一性,而关键膜结合酶(如 YBJX_ECOLI)的丢失又削弱了底物运输效率. 这些问题的叠加使得实验组裂解液在翻译效率上显著落后于超声对照组.

2.4 溶菌酶法与超声法所制备裂解液的对比

在优化条件下,通过溶菌酶法制备得到了大肠杆菌的细胞裂解液,并与常规超声法制备的裂解液进行对比,在 CFPS 反应中加入不同浓度的 DNA 模板,比较两种裂解液对于 sfGFP 蛋白的体外表达能力.

如图 9 所示,两种裂解液参与的 CFPS 蛋白表达水平均随着 DNA 模板加入量的增加而增加. 对于溶菌酶裂解液体系,随着 DNA 模板加入量从 50 ng 增加至 200 ng, sfGFP 表达量从 $(653.15 \pm 5.91) \mu\text{g/mL}$ 逐步提升至 $(781.30 \pm 5.31) \mu\text{g/mL}$, 达到峰值后趋于饱和(250 ng 与 300 ng 组的表达量分别为 $(775.18 \pm 27.18) \mu\text{g/mL}$ 和 $(770.65 \pm 32.45) \mu\text{g/mL}$). 相比之下,常规超声裂解液在相同 DNA 梯度下的表达量始终偏低,其最高值(200 ng 组)为 $(739.81 \pm 5.33) \mu\text{g/mL}$.

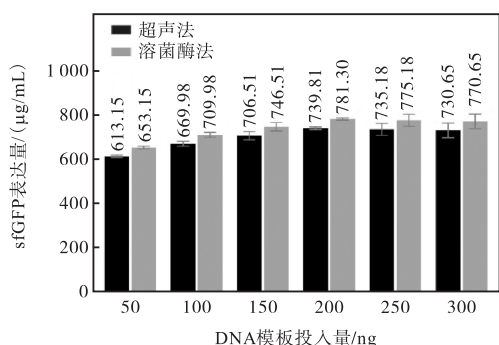


图 9 在两种不同的裂解液中投入梯度 DNA 模板量对目的蛋白表达量的影响

Fig.9 Effects of graded DNA template dosage on target protein expression levels in two different lysates

值得注意的是,两种不同的裂解液均在 250 ~ 300 ng 区间出现平台效应,表明系统存在动态饱和和机制. 这种非线性响应可通过转录-翻译资源竞争模型解释:在 200 ng DNA 加入量时, RNA 聚合酶与核糖体的通量达到最佳配比;当 DNA 模板加入过多时,游离 DNA 与转录复合物形成无效结合,同时引发核糖体排队效应^[26-27].

由此可见,经优化制备的溶菌酶裂解液与传统超声裂解液相比,在表达梯度 DNA 模板时,两者可达到一致的蛋白表达水平,验证了基于溶菌酶裂解大肠杆菌制备裂解液用于 CFPS 反应的可行性.

3 结 语

近年来,无细胞蛋白合成(CFPS)系统因其高效

性与可控性,在合成生物学与生物医药领域展现出广阔应用潜力. 然而,传统超声裂解法制备细胞裂解液存在设备依赖性强、易损伤功能组分等缺陷. 本研究基于溶菌酶的温和裂解策略,开发了一种新型大肠杆菌裂解液制备方法,其目标蛋白表达效率与超声法相当. 本方法的创新性在于通过生物酶解替代高能耗物理或化学裂解,降低了制备成本与操作复杂性,同时避免了核糖体复合物与代谢酶系的不可逆损伤. 该策略有望提升 CFPS 系统的表达效率和稳定性,助力 CFPS 体系在毒性蛋白或膜蛋白合成、功能蛋白设计筛选、人工代谢通路设计等领域的应用.

参考文献:

- [1] Wilding K M, Zhao E L, Eari C C, et al. Thermostable lyoprotectant-enhanced cell-free protein synthesis for on-demand endotoxin-free therapeutic production[J]. *New Biotechnology*, 2019, 53: 73-80.
- [2] Miguez A M, Mcnerney M P, Styczynski M P. Metabolic profiling of *Escherichia coli*-based cell-free expression systems for process optimization[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2019, 58(50): 22472-22482.
- [3] Hunt J P, Yang S O, Wilding K M, et al. The growing impact of lyophilized cell-free protein expression systems [J]. *Bioengineered*, 2017, 8(4): 325-330.
- [4] Ramm F, Jack L, Kaser D, et al. Cell-free systems enable the production of AB5 toxins for diagnostic applications[J]. *Toxins*, 2022, 14(4): 233.
- [5] Siddiquee R, Kwan A H. Cell-free synthesis of correctly folded proteins with multiple disulphide bonds: Production of fungal hydrophobins[J]. *Bio-Protocol*, 2021, 11(10): e4019.
- [6] Sato W, Sharon J, Deich C, et al. Akaby—Cell-free protein expression system for linear templates[J]. *PLoS One*, 2022, 17(4): 266-272.
- [7] Foshag D, Henrich E, Hiller E, et al. The *E. coli* S30 lysate proteome: A prototype for cell-free protein production[J]. *New Biotechnology*, 2018, 40: 245-260.
- [8] Piorino F, Styczynski M P. Complex dependence of *Escherichia coli*-based cell-free expression on sonication energy during lysis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(10): 3131-3136.
- [9] Joshi H, Jain V. Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein[J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 528: 1-6.

- [10] Bednarska I, Malycheva D, Kristensson M A. Complete solubilization of mammalian cells in lysates[J]. *MethodsX*, 2024, 13: 102860.
- [11] Nawaz N, Wen S, Wang F, et al. Lysozyme and its application as antibacterial agent in food industry[J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6305.
- [12] Ferraboschi P, Ciceri S, Grisenti P. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic[J]. *Antibiotics*, 2021, 10(12): 1534.
- [13] Levashov P A, Matolygina D A, Ovchinnikova E D, et al. The bacteriolytic activity of native and covalently immobilized lysozyme against Gram-positive and Gram-negative bacteria is differentially affected by charged amino acids and glycine[J]. *Federation of European Biochemical Societies Open Bio*, 2019, 9(3): 510-518.
- [14] Hsiang C C, Ng I S. ASIA: An automated stress-inducible adaptor for enhanced stress protein expression in engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2024, 121(6): 1902-1911.
- [15] Castro R, Reguera-Brito M, López-Campos G H, et al. How does temperature influences the development of lactococcosis? Transcriptomic and immunoproteomic in vitro approaches[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, 10(12): 1285-1297.
- [16] Zhai L H, Chang C, Li N, et al. Systematic research on the pretreatment of peptides for quantitative proteomics using a C18 microcolumn[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 13(15): 2229-2237.
- [17] Jehmlich N, Golatowski C, Murr A, et al. Comparative evaluation of peptide desalting methods for salivary proteome analysis[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2014, 434: 16-20.
- [18] Pandiarajan I, Walunj S B, Banerjee N, et al. Application of bio-layer interferometry for the analysis of ribosome-protein interactions[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2024, 11: 1398964.
- [19] Bardallo R G, Da Silva R T, Carbonell T, et al. Liver graft hypothermic static and oxygenated perfusion (HOPE) strategies: A mitochondrial crossroads[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5742.
- [20] Banerjee R, Purhonen J, Kallijärvi J. The mitochondrial coenzyme Q junction and complex III: Biochemistry and pathophysiology[J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(22): 6936-6958.
- [21] Cheng Y, Miwa T, Taguchi H. The mRNA binding-mediated self-regulatory function of small heat shock protein IbpA in γ -proteobacteria is conferred by a conserved arginine[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(9): 105108.
- [22] Suzuki H, Fukuyama K, Kumagai H. Bacterial γ -glutamyltranspeptidases, physiological function, structure, catalytic mechanism and application[J]. *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences*, 2020, 96(9): 440-469.
- [23] Mitrić A, Castellano I. Targeting gamma-glutamyl transpeptidase: A pleiotropic enzyme involved in glutathione metabolism and in the control of redox homeostasis[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2023, 208: 672-683.
- [24] Grotehans N, McGarry L, Nolte H, et al. Ribonucleotide synthesis by NME6 fuels mitochondrial gene expression[J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2023, 42(18): e113256.
- [25] EL-Mansi M. Contrasting effects of isocitrate dehydrogenase deletion on fluxes through enzymes of central metabolism in *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(15): fnz187.
- [26] Mahima, Sharma A K. Optimization of ribosome utilization in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PNAS Nexus*, 2023, 2(3): pgad074.
- [27] Erdmann-Pham D D, Dao D K, Song Y S. The key parameters that govern translation efficiency[J]. *Cell Systems*, 2020, 10(2): 183-192.

(责任编辑: 田 军)