

SISTEMA LIBRE DE CÉLULAS: PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS IN VITRO

Blanca Patricia Lozano Pedraza¹, Fernanda Nallely Balandrán Guardado¹, Liliana Martínez Villanueva¹, Fernanda Mendoza Acosta^{2*}, José E. Barboza Corona^{1,2*}

¹Departamento de Alimentos, ²Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca

*Autores para correspondencia: josebar@ugto.mx

Resumen

Los sistemas sin células han logrado posicionarse a lo largo del tiempo, convirtiéndose en métodos claves para aplicaciones de biología sintética. Estos sistemas han sustituido y generado diseños benéficos para la manipulación de sistemas biológicos y la producción de proteínas. La síntesis de proteínas libres de células (CFS) ha crecido de tal manera que se ha convertido en una plataforma potente para la producción de proteínas de alto rendimiento. En comparación de la expresión clásica de proteínas in vivo, los sistemas libres de células no necesitan clonación ya que consumen mucho tiempo, y la naturaleza abierta proporciona una fácil manipulación de las condiciones de reacción y por lo tanto un potencial de alto rendimiento. En esta revisión discutimos las oportunidades futuras en el área de alimentos, las ventajas, aplicaciones recientes en la síntesis de proteínas libres de células, así como el uso de sistemas libres de células para el diseño, fabricación y estudio de dicha producción.

Palabras clave: Biología sintética; síntesis proteínas

Introducción

Con el paso del tiempo la ciencia sigue evolucionando satisfactoriamente en base a las necesidades bio-industriales, esto se ha logrado gracias a la incorporación de diferentes disciplinas tal como la biología sintética la cual se ha enfocado en la creación de nuevas tendencias. Así mismo los sistemas libres de células han llamado cada vez más la atención, puesto que sirven como una herramienta para lograr funciones biológicas complejas fuera de la célula. Los CFS se han convertido en una opción ideal para la creación de prototipos, la producción de proteínas y la bio-detección, debido a su alto control, tolerancia, estabilidad y capacidad para producir proteínas en poco tiempo (Zhang et al., 2021). Sin embargo, para lograr estos objetivos, es necesario que los componentes de reacción libres de células se conserven mediante métodos de encapsulación o liofilización, los cuales involucran la incorporación de componentes en matrices porosas como papel o hidrogeles (Silverman et al., 2020).

En este trabajo se utilizó como modelo *E. coli* ya que esta bacteria es uno de los sistemas más utilizados para la producción de proteína tanto in vivo como en sistema libre de células. Este microorganismo tiene la capacidad de crecer rápidamente con alta densidad en medios de cultivo de bajo costo, y en el mercado hay una gran disponibilidad de cepas mutantes, tal como el sistema BL21 (Lesley et al., 2005).

Biología sintética

La biología sintética propone diseñar y construir nuevos aspectos biológicos, mecanismos, o re-diseñar sistemas existentes que logren brindar cualidades con un propósito definido como la adaptación, evolución, conocimiento e interacción entre sistemas de manera modular; confiable y predecible (Khalil et al., 2010).

La aplicación de la biología sintética ha logrado el desarrollo de muchas tecnologías que requieren la utilización de una célula completa (Voigt et al., 2010) ya que pueden ser capaces de modificar o transformar diversos aspectos de la vida moderna. Sin embargo, los cuestionamientos de la bioseguridad han restringido el uso de células modificadas (Lee et al., 2018). Esto es debido a que los sistemas basados en células pueden conllevar un riesgo de escape o contaminación que podría afectar la salud humana, la seguridad alimentaria y el medio ambiente (Jia et al., 2017). Por lo anterior, la biología sintética ha optado por los sistemas libres de células ya que estos pueden funcionar como una herramienta para facilitar la síntesis de proteínas *in vitro* (Harbers et al., 2014).

Sistema libre de células

Los sistemas libres de células actualmente se han convertido en elementos clave para aplicaciones en biología sintética (Tinafar et al., 2019), puesto que se han hecho importantes aportaciones a la comprensión de diversas disciplinas como la biología molecular, bioquímica fundamental y el entendimiento de circuitos genéticos complejos (Tinafar et al., 2019). Inicialmente estos sistemas se crearon como herramientas para facilitar la síntesis de proteínas *in vitro* (Martin et al., 2017). La producción de proteínas libres de células ha permitido la elaboración de proteínas recombinantes de una manera más rápida y económica (Perez et al., 2016). Básicamente los sistemas libres de células, contienen enzimas necesarias para realizar la transcripción, la traducción y, en general, los procesos fundamentales del dogma central (ADN→ARN→proteína) independientemente de una célula (Figura 1) (Martin et al., 2017)

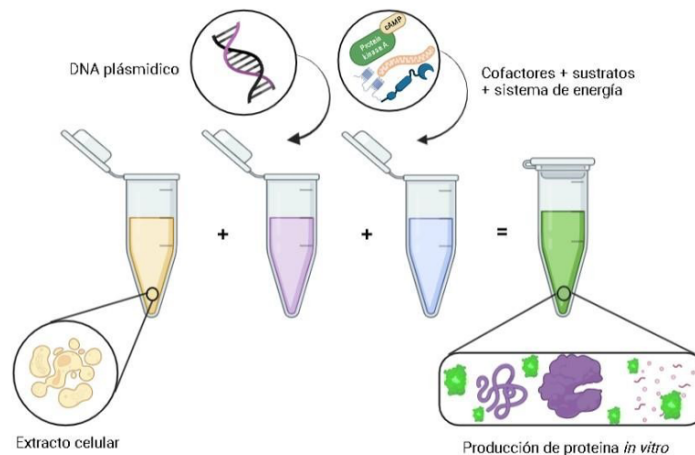


Figura 1. Esquema representativo de la síntesis de proteínas libres de células.

Los CFS hacen referencia a que no existe una barrera física (p. ej., una pared celular para la programación y la modificación). El rendimiento de este tipo de sistemas "CFS" se puede acrecentar con el uso de proteínas o moléculas pequeñas mejorando las redes de los genes sintéticos o la eficacia de las reacciones (Didovyk et al., 2017).

Una ventaja importante de los CFS es que se pueden liofilizar permitiendo el almacenamiento y la distribución de la temperatura ambiente durante su proceso, para la activación de estos sistemas lo único que se necesita es agregar agua en el momento en el que se deseen aplicar (Pardee et al., 2014). Esta característica es una gran ventaja para estos sistemas ya que se han utilizado para implementar herramientas codificadas genéticamente y bioseguras. Así mismo en la ejecución de temas completamente nuevos, como lo son la educación global y la salud (Pardee et al., 2016).

Historia

En la década de 1960 Nirenberg y Matthaei por primera vez utilizaron extractos libres de células de *E. coli* con la finalidad de poder descifrar la secuencia del código genético (Nirenberg et al., 1961). Tiempo después Spirin y colaboradores mejoraron la vida útil operativa de la producción de proteínas con intercambios continuos de reactivos y productos, sin embargo, se tenían ciertas deficiencias; sólo se podía sintetizar un solo producto y se mantenían con energía limitada (Spirin et al., 1988). Posteriormente los CFS se mejoraron al producir ATP utilizando nivel de sustrato y de fosforilación oxidativa (Jewett et al., 2004).

Eduard Buchner fue el primero en presentar un sistema libre de células utilizando extractos de levadura. Sin embargo, desde entonces se han encontrado fuentes alternativas que han ayudado a un mejor desarrollo de la biología sintética (Barnett et al., 2001).

Características

Los sistemas libres de células son una herramienta *in vitro* altamente utilizada para el estudio de las reacciones biológicas que ocurren dentro de las células, además los CFS pueden reducir complejas interacciones que se encuentran en una célula completa (Swartz, 2006). De igual modo con estos sistemas se puede realizar la producción de proteínas a una alta velocidad incluyendo las proteínas que pueden llegar a ser tóxicas para las células (Ezure et al., 2010), es decir; la síntesis de proteínas libres de células (CFS) es una forma de síntesis de proteínas rápida (Carlson et al., 2012; Gregorio et al., 2012), puesto que de esta manera se logran obtener grandes cantidades de proteínas con características similares a las convencionales mediante técnicas de ingeniería genética y cultivo celular (Swartz, 2006).

Tipos de sistemas libres de células

Los sistemas libres de células se pueden clasificar en dos principales tipos: aquellos que son basados en extractos de células, los cuales eliminan los componentes del interior de la célula para su uso externo, y aquellos que son basados en enzimas purificadas, este tipo de sistema requiere la utilización de componentes purificados de las moléculas que van a participar en un proceso determinado. El sistema que implica extracto celular se considera susceptible a problemas como lo es la degradación rápida de componentes, fuera de su anfitrión, ya que puede hacer que el ARNm se degrade rápidamente e interrumpa la síntesis de proteínas (Joseph et al., 2013).

Aplicaciones

Actualmente los sistemas libres de células se utilizan en una gran variedad de aplicaciones debido a que son más eficientes y rápidos, estos pueden ir desde la producción de proteínas terapéuticas a la biología sintética (Hodgman et al., 2012). Así mismo existen varias plataformas de tecnologías CFS, tales como PANOx-SP y Cytomin las cuales fueron desarrolladas por Swartz y colaboradores y la plataforma TX/TL de Noireaux. Por otra parte, también se ha dispuesto una gran variedad de CFS basados en extractos de células eucariotas. Uno de los más reconocidos es el extracto de germen de trigo (WGE), el cual se ha utilizado como un CFS eficiente para la producción de una amplia variedad de proteínas funcionales (Madin et al., 2000).

De tal manera que la vía sintética sin células se ha posicionado como una nueva técnica de bio-fabricación de bajo costo, en comparación de la fermentación microbiana, que ha sido utilizada durante miles de años (Gregorio et al., 2019). Por lo que estos bio-sistemas libres de células tienen un par de ventajas exitosas dentro de las aplicaciones industriales (Joseph A et al., 2013).

Ventajas sobre sistemas *in vivo*

Los CFE tienen muchos beneficios que van dirigidos a la síntesis de proteínas *in vivo*, una de las principales ventajas es que los CFS permiten la expresión génica tanto del ADN plasmídico como de las plantillas de expresión lineal (McSweeney et al 2021), por lo que estos sistemas se consideran como herramientas bastante

efectivas para la realización de programas genéticos o la síntesis de proteínas *in vitro*. Una de las formas más comunes de los CFS, es que son sistemas basados en lisado, el cual se compone de un extracto celular crudo generalmente de *E. coli*, el cual es combinado con cofactores suplementados y sustratos esenciales para transcripción y traducción (Khambhati et al., 2019).

Así como también las limitaciones de transporte inherentes a los sistemas de células completas debidas a la membrana celular se reducen en los CFE debido a que no tienen membrana, lo que genera un mejor control sobre la dosis de plásmido, pH y los niveles de inductor (Swartz 2006). Por otro lado, los sistemas libres de células también son capaces de eliminar los problemas de toxicidad celular que surgen *in vivo* a partir de la expresión de ciertas proteínas, evitando la inestabilidad del plásmido que a menudo es causada por la toxicidad (Katzen et al., 2005).

Estos sistemas han acelerado la investigación de los principios biológicos (Nirenberg y Leder, 1964) y a su vez se han aplicado en entornos que van desde la producción de proteínas a gran escala de relevancia industrial (Zawada et al., 2011) hasta la detección previa de la síntesis de glicoproteínas (Schoborg et al., 2018). Son considerados sistemas atractivos para el desarrollo de sensores, con aplicaciones ambientales (Verosloff et al., 2019; Thavarajah et al., 2020) y diagnósticos biomédicos fáciles de usar (McNerney et al., 2019).

En general estos sistemas son bastantes eficaces ya que reducen la complejidad, eliminan las barreras estructurales y no requieren el mantenimiento de la viabilidad celular. Sin embargo, los sistemas libres de células se han visto limitados por su incapacidad para coactivar múltiples redes bioquímicas en una única plataforma integrada (Jewett et al., 2008).

Perspectivas con énfasis en el área de alimentos

La producción de proteínas por medio de sistemas libres de células es uno de los grandes objetivos en la actualidad, debido a que las proteínas elaboradas de forma natural no logran ser eficaces para su uso de forma industrial o de laboratorio debido a las altas inversiones en tiempo y dinero, es por ello que algunas se han elaborado de forma recombinante con el fin de mejorar la producción, sin embargo, se tienen grandes perspectivas en que la mayoría de las proteínas existentes puedan ser obtenidas por medio de sistemas libres de células, siendo el mejor método para su producción.

La hemoglobina es una proteína que contiene un pigmento rojizo y que transporta y almacena oxígeno a través del músculo. El hemo se encuentra en la hemoglobina de la sangre siendo el hierro su principal elemento químico que es el que le confiere el sabor característico a la carne. En la actualidad se produce hemoglobina recombinante por medio de la bacteria *E. coli*; sin embargo, (Villarreal et al., 2008) mencionan que debe estar presente suficiente hemo intracelular, o la proteína se pliega incorrectamente y se degrada, por lo que al producir hemoglobina libre de células además de evitar una degradación de esta proteína, se produciría con mayor rapidez, y se obtiene de forma mucho más factible (Winslow et al., 2008).

La caseína es una proteína que se encuentra en productos lácteos y se caracteriza por darles el color blanco; es una proteína que tiene todos los aminoácidos esenciales que nuestro cuerpo necesita para funcionar (Climan., 2021). Esta proteína se ha elaborado de forma recombinante, recibiendo un amplio interés por lograr un alto rendimiento, además de obtener la estructura específica en la que están presentes las caseínas (Hettinga et al., 2022). Al elaborar una caseína libre de células por medio de germen de trigo se produciría un aumento de unas 250 veces en comparación con los métodos recombinantes, por lo que la aplicación de sistemas libres de células sería el mejor método para su producción (Takemoto et al., 1980).

Por otra parte, la beta-lactoglobulina (β -Lg) es la proteína que se encuentra en el suero de la leche de animales rumiantes. Se ha producido β -lactoglobulina bovina recombinante mediante la proteína *E. coli* utilizando un gen de proteína manipulando, obteniendo una proteína idéntica a la natural, con mayor producción y más económica (Loch et al., 2016), sin embargo, se ha realizado una síntesis de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina *in vitro* mediante sistemas libres de células derivados de las glándulas mamarias de la oveja lactante, al obtener buenos resultados se espera realizar el mismo procedimiento en glándulas mamarias de vaca para la obtención de beta-lactoglobulina de forma mucho más rápida, económica en comparación con la recombinante ya existente (Gaye et al., 1972).

Otra proteína importante derivada del huevo es la albúmina que representa un 54-60% del total de sus proteínas, se localiza en la clara y tiene un alto valor biológico en la naturaleza debido a que cuenta con todos los aminoácidos esenciales. Esta proteína se ha elaborado de forma recombinante sin componentes de origen animal, ofreciendo una gran flexibilidad en cuanto al tamaño de producción, así como bajos costes (Farrán., 2001). Actualmente se pretende realizar síntesis de albúmina por medio de una síntesis de proteínas libres de

células derivadas de un extracto de germen de trigo, logrando una gran producción de albúmina por medio de un método mucho más eficaz, rápido, y económico sin necesidad de utilizar animales para su producción (Tse et al., 1977).

De igual manera, la Ovotransferrina es una proteína derivada de la clara del huevo, siendo una proteína que sobresale por sus grandes beneficios, es por ello por lo que es muy usada en el sector alimenticio industrial y farmacéutico, logrando ser obtenida de forma recombinante para disminuir costos y tiempos, además sin utilizar animales para su producción (Mizutani et al., 2004). Esta proteína no se ha logrado elaborar por medio de sistemas libres de células, siendo uno de los objetivos futuros para poder ser obtenida sin necesidad de productos de origen animal, lograr una amplia gama de proteínas con alto rendimiento para una gran variedad de aplicaciones posteriores, logrando así ser útil para el sector alimenticio y farmacéutico, pues para obtener esta proteína de forma natural y recombinante es poco eficiente (Chong 2014).

La Lisozima es una proteína del huevo de alto interés industrial, se encuentra de forma soluble en la clara del huevo y se utiliza en especial en bodegas para el control de las bacterias lácticas de los vinos. Actualmente se han elaborado lisozimas de forma recombinante por medio de hongos filamentosos, obteniendo buenas producciones y costos bajos; sin embargo, la demanda de esta proteína a nivel industrial es elevada, por lo que se comprobó que elaborarla de forma recombinante es mejor que de forma natural, pero no el mejor método (Schweiger et al., 1969). La elaboración de lisozima por medio de sistemas libres de células ha sido una gran alternativa, pues se cree que su producción será mucho mayor que de forma recombinante, siendo una gran opción para realizar grandes producciones, más económica, ahorrando tiempo y así poder realizar muchos más estudios sobre los beneficios que contiene; esta teoría se ha logrado con otras proteínas, por lo que se cree que con la albúmina se puede lograr grandes resultados (Cappannella et al., 2016).

La ovomucina es una proteína que comprende un 3.5 % aproximadamente del total del huevo y es la que le confiere la estructura de gel a la clara espesa. En la actualidad esta proteína no se ha elaborado de forma recombinante, debido a su baja demanda. Una producción masiva estandarizada a través de sistema libre de células, podría permitir ampliar el uso de dicha proteína en otros productos como gelificante (Tu et al., 2020).

En general, la producción de proteínas a través de un sistema libre de células aún tiene muchas cosas por explorar y por establecer para mejorar el sistema de producción. Finalmente, el sistema libre de células es ideal para probar estrategias racionales de biodiseño, guiados por modelos y de ingeniería avanzada (Laohakunakorn Nandanai. 2020).

Referencias

- Barnett, J. A., & Lichtenhaler, F. W. (2001). A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. *Yeast (Chichester, England)*, 18(4), 363–388. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20010315\)18:4<363::AID-YEA677>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20010315)18:4<363::AID-YEA677>3.0.CO;2-R)
- Caleb Danziger, (2020). La ciencia detrás de la carne vegetal con sabor a carne. *Food Unfolded*. Obtenido del sitio web: <https://www.foodunfolded.com/es/articulo/la-ciencia-detras-de-la-carne-vegetal-con-sabor-a-carne>.
- Cappannella, E., Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K., Bavaro, T., & Esti, M. (2016). Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study. *Food chemistry*, 210, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.089>
- Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, et al. (2012). Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Advanced in biotechnology*. pp: 30 :1185–1194. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.016.
- Chong S. (2014). Overview of cell-free protein synthesis: historic landmarks, commercial systems, and expanding applications. *Current protocols in molecular biology*, 108, 16.30.1–16.30.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1630s108>
- Clancy, K., & Voigt, C. A. (2010). Programming cells: towards an automated 'Genetic Compiler'. *Current opinion in biotechnology*, 21(4), 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.005>
- Climan.A. (2021). La caseína es una proteína de la leche utilizada como suplemento dietético. *Verywell Health*. Obtenido del sitio web: <https://www.verywellhealth.com/casein-5081318>.

- Didovyk, A., Tonooka, T., Tsimring, L., & Hasty, J. (2017). Rapid and Scalable Preparation of Bacterial Lysates for Cell-Free Gene Expression. *ACS synthetic biology*, 6(12), 2198–2208. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00253>
- Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E., Utsumi, T., Nishimura, O., & Tsunasawa, S. (2010). Development of an insect cell-free system. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(3), 279–284. <https://doi.org/10.2174/138920110791111997>
- Farran Blanch. (2001). Production of human albumin in tubers of transgenic potato plants. 2022, de Dialnet Sitio web: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=146029>.
- Gregorio, N. E., Levine, M. Z., & Oza, J. P. (2019). A User's Guide to Cell-Free Protein Synthesis. *Methods and protocols*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.3390/mps2010024>
- Harbers M. (2014). Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS letters*, 588(17), 2762–2773. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.061>
- Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2012). Cell-free synthetic biology: thinking outside the cell. *Metabolic engineering*, 14(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.09.002>
- Jia, B., Qi, H., Li, B. Z., Pan, S., Liu, D., Liu, H., Cai, Y., & Yuan, Y. J. (2017). Orthogonal Ribosome Biofirewall. *ACS synthetic biology*, 6(11), 2108–2117. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00148>
- Jewett, M. C., Calhoun, K. A., Voloshin, A., Wu, J. J., & Swartz, J. R. (2008). An integrated cell-free metabolic platform for protein production and synthetic biology. *Molecular systems biology*, 4, 220. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.57>
- Jewett, M. C., & Swartz, J. R. (2004). Mimicking the Escherichia coli cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. *Biotechnology and bioengineering*, 86(1), 19–26. <https://doi.org/10.1002/bit.2002617>.
- Hettinga, K., & Bijl, E. (2022). Can recombinant milk proteins replace those produced by animals?. *Current opinion in biotechnology*, 75, 102690. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102690>
- Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2010). Synthetic biology: applications come of age. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), 367–379. <https://doi.org/10.1038/nrg2775>
- Khambhati, K., Bhattacharjee, G., Gohil, N., Braddick, D., Kulkarni, V. y Singh, V. (2019). Exploring the Potential of Cell-Free Protein Synthesis for Extending the Abilities of Biological Systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 11. REVIEW article: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00248>
- Katzen, F., Chang, G. y Kudlicki, W. (2005). El pasado, presente y futuro de la síntesis de proteínas libres de células. *Tendencias Biotecnología*. 23 (3), 150–156. [doi:10.1016/j.tibtech.2005.01.003](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.01.003).
- Laohakunakorn, Nadanai. (2020). Sistemas sin células: un campo de pruebas para el biodiseño racional. *Fronteras en bioingeniería y biotecnología*, vol. 8, Fronteras, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00788>
- Lee, J. W., Chan, C., Slomovic, S., & Collins, J. J. (2018). Next-generation biocontainment systems for engineered organisms. *Nature chemical biology*, 14(6), 530–537. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0056-x>
- Lesley, S. A. y Wilson, I. A. 2005. Protein production and crystallization at the joint center for structural genomics. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 6:71-79
- Lesley, S. A., & Wilson, I. A. (2005). Protein production and crystallization at the joint center for structural genomics. *Journal of structural and functional genomics*, 6(2-3), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s10969-005-2897-2>
- Loch, J. I., Bonarek, P., Tworzydło, M., Polit, A., Hawro, B., Łach, A., Ludwin, E., & Lewiński, K. (2016). Engineered β -Lactoglobulin Produced in E. coli: Purification, Biophysical and Structural Characterisation. *Molecular biotechnology*, 58(10), 605–618. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9960-z>
- Tinafar, A., Jaenes, K., & Pardee, K. (2019). Synthetic Biology Goes Cell-Free. *BMC biology*, 17(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0685-x>

- Thavarajah, W., Silverman, A. D., Verosloff, M. S., Kelley-Loughnane, N., Jewett, M. C., & Lucks, J. B. (2020). Point-of-Use Detection of Environmental Fluoride via a Cell-Free Riboswitch-Based Biosensor. *ACS synthetic biology*, 9(1), 10–18. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b0034>
- Takemoto, T., Nagamatsu, Y., & Oka, T. (1980). Casein and alpha-lactalbumin messenger RNAs during the development of mouse mammary gland. Isolation, partial purification, and translation in a cell-free system. *Developmental biology*, 78(2), 247–257. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90334-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90334-6)
- Tu, A., Zhao, X., Shan, Y., & Lü, X. (2020). Potential role of ovomucin and its peptides in modulation of intestinal health: A review. *International journal of biological macromolecules*, 162, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.148>
- Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., & Endo, Y. (2000). A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 559–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.559>
- Martin, R. W., Majewska, N. I., Chen, C. X., Albanetti, T. E., Jimenez, R., Schmelzer, A. E., Jewett, M. C., & Roy, V. (2017). Development of a CHO-Based Cell-Free Platform for Synthesis of Active Monoclonal Antibodies. *ACS synthetic biology*, 6(7), 1370–1379. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00001>
- McNerney, M. P., Zhang, Y., Steppe, P., Silverman, A. D., Jewett, M. C., & Styczynski, M. P. (2019). Point-of-care biomarker quantification enabled by sample-specific calibration. *Science advances*, 5(9), eaax4473. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4473>
- McSweeney, M. A., & Styczynski, M. P. (2021). Effective Use of Linear DNA in Cell-Free Expression Systems. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 715328. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.715328>
- Mizutani, K., Okamoto, I., Fujita, K., Yamamoto, K., & Hirose, M. (2004). Structural and functional characterization of ovotransferrin produced by *Pichia pastoris*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(2), 376–383. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.376>
- NIRENBERG, M. W., & MATTHAEI, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(10), 1588–1602. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.10.1588>
- Nirenberg, M. y Leder, P. (1964). RNA Codewords and Protein Synthesis: The Effect of Trinucleotides upon the Binding of sRNA to Ribosomes. *Science* 145 (3639), 1399–1407. <https://doi.org/10.1126/science.145.3639.1399>
- Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y., & Alakhov, Y. B. (1988). A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4882), 1162–1164. <https://doi.org/10.1126/science.3055301>
- Schoborg, J. A., Hershewe, J. M., Stark, J. C., Kightlinger, W., Kath, J. E., Jaroentomeechai, T., Natarajan, A., DeLisa, M. P., & Jewett, M. C. (2018). A cell-free platform for rapid synthesis and testing of active oligosaccharyltransferases. *Biotechnology and bioengineering*, 115(3), 739–750. <https://doi.org/10.1002/bit.26502>
- Swartz J. (2006). Developing cell-free biology for industrial applications. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 33(7), 476–485. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0127-y>
- Gaye, P., Viennot, N., & Denamur, R. (1972). Nucleic acid and protein synthesis, *Biochimica et biophysica acta*, 262(3), 371–380, of ScienceDirect website: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0005>.
- Gaye, P., Viennot, N., & Denamur, R. (1972). In vitro synthesis of -lactalbumin and -lactoglobulin by microsomes and bound polyribosomes from the mammary gland of lactating sheep. *Biochimica et biophysica acta*, 262(3), 371–380. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(72\)90275-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90275-4)
- Pardee, K., Green, A. A., Ferrante, T., Cameron, D. E., DaleyKeyser, A., Yin, P., & Collins, J. J. (2014). Paper-based synthetic gene networks. *Cell*, 159(4), 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.004>

- Pardee, K., Slomovic, S., Nguyen, P. Q., Lee, J. W., Donghia, N., Burrill, D., Ferrante, T., McSorley, F. R., Furuta, Y., Vernet, A., Lewandowski, M., Boddy, C. N., Joshi, N. S., & Collins, J. J. (2016). Portable, On- Demand Biomolecular Manufacturing. *Cell*, 167(1), 248–259.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.013>
- Perez, J. G., Stark, J. C., & Jewett, M. C. (2016). Cell-Free Synthetic Biology: Engineering Beyond the Cell. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(12), a023853. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023853>
- Rollin, Joseph A.; Tam, Tsz Kin; Zhang, Y.-H. Percival (2013). New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing. *Green chemistry*. 15 (7): 1708 <https://doi.org/10.1039/c3gc40625c>.ISSN 1463-9270.
- Samuel, P. P., Smith, L. P., Phillips, G. N., Jr, & Olson, J. S. (2015). Apoglobin Stability Is the Major Factor Governing both Cell-free and in vivo Expression of Holomyoglobin. *The Journal of biological chemistry*, 290(39), 23479–23495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672204>
- Schweiger, M., & Gold, L. M. (1969). Bacteriophage T4 DNA-dependent in vitro synthesis of lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 63(4), 1351–1358. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.4.1351>
- Silverman, A. D., Karim, A. S., & Jewett, M. C. (2020). Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications. *Nature reviews. Genetics*, 21(3), 151–170. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0186-3>
- Swartz J. (2006). Developing cell-free biology for industrial applications. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 33(7), 476–485. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0127-y>
- Tse, T. P., & Taylor, J. M. (1977). Translation of albumin messenger RNA in a cell-free protein-synthesizing system derived from wheat germ. *The Journal of biological chemistry*, 252(4), 1272–1278.
- Verosloff, M., Chappell, J., Perry, K. L., Thompson, J. R., & Lucks, J. B. (2019). PLANT-Dx: A Molecular Diagnostic for Point-of-Use Detection of Plant Pathogens. *ACS synthetic biology*, 8(4), 902–905. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00526>
- Villarreal, D. M., Phillips, C. L., Kelley, A. M., Villarreal, S., Villaloboz, A., Hernandez, P., Olson, J. S., & Henderson, D. P. (2008). Enhancement of recombinant hemoglobin production in *Escherichia coli* BL21(DE3) containing the *Plesiomonas shigelloides* heme transport system. *Applied and environmental microbiology*, 74(18), 5854–5856. <https://doi.org/10.1128/AEM.01291-08>
- Winslow R. M. (2008). Cell-free oxygen carriers: scientific foundations, clinical development, and new directions. *Biochimica et biophysica acta*, 1784(10), 1382–1386. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.032>
- Zawada, J. F., Yin, G., Steiner, A. R., Yang, J., Naresh, A., Roy, S. M., Gold, D. S., Heinsohn, H. G., & Murray, C. J. (2011). Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and bioengineering*, 108(7), 1570–1578. <https://doi.org/10.1002/bit.23103>
- Zhang, L., Lin, X., Wang, T., Guo, W., & Lu, Y. (2021). Development and comparison of cell-free protein synthesis systems derived from typical bacterial chassis. *Bioresources and bioprocessing*, 8(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00413-2>