

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.66:577.217.3+579.842.11

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-271-276>

Поступила в редакцию 15.01.2021

Received 15.01.2021

И. С. Казловский, А. И. Зинченко

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

БИОСИНТЕЗ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* В СИСТЕМЕ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА

Аннотация. Одним из новых перспективных направлений молекулярной биотехнологии является бесклеточный синтез белка (БСБ). Процедура БСБ основана на реконструкции *in vitro* всех этапов биосинтеза белка в клетке, включая транскрипцию, аминоацилирование тРНК и трансляцию мРНК рибосомами.

Ранее нами был сконструирован штамм *Escherichia coli*, продуцирующий гомологичную аденозиндезаминазу (АДазу). В настоящем исследовании в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию в ферментере, была изучена возможность синтеза АДазы в системе БСБ. Для синтеза этого фермента использовали S30-клеточный экстракт *E. coli*, РНК-полимеразу бактериофага Т7 и высококопийный плазмидный вектор pET42mut со встроенным в него геном АДазы.

В результате выполнения работы нами впервые продемонстрирована возможность синтеза АДазы *E. coli* в системе БСБ. В частично оптимизированных условиях проведения процесса получен экспериментальный образец рекомбинантной АДазы с активностью 530 Ед/мл ферментного препарата.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, *Escherichia coli*, бесклеточный синтез белка, высококопийная pET42mut-плазмида, ферментный препарат

Для цитирования: Казловский, И. С. Биосинтез аденозиндезаминазы *Escherichia coli* в системе бесклеточного синтеза белка / И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 271–276. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-271-276>

Illia S. Kazlouski, Anatoli I. Zinchenko

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

BIOSYNTHESIS OF *ESCHERICHIA COLI* ADENOSINE DEAMINASE USING CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS

Abstract. One of the recent perspective trends of molecular biotechnology is cell-free protein synthesis (CFPS). The procedure of CFPS is based on *in vitro* reconstruction of all stages of a biosynthesis of protein in a whole cell, including a transcription, an aminoacylation of tRNA and translation of mRNA by ribosomes.

Previously, we constructed a strain *Escherichia coli* that produces homologous adenosine deaminase (ADase). In the present study, as an alternative to canonical submerged cultivation in a fermenter, the possibility of the ADase synthesis in the system of CFPS was studied. For synthesis of this enzyme we used the *E. coli*-30 cell extract, T7 bacteriophage RNA polymerase, and high-copy plasmid vector pET42mut with gene ADase inserted into it.

As a result of the work we have demonstrated for the first time the possibility of synthesis of ADase *E. coli* in the CFPS system. In a partially optimized process conditions, an experimental sample of recombinant AD with an activity of 530 U/ml of enzyme preparation was obtained.

Keywords: adenosine deaminase, *Escherichia coli*, cell-free protein synthesis, high-copy pET42mut plasmid, enzyme preparation

For citation: Kazlouski I. S., Zinchenko A. I. Biosynthesis of *Escherichia coli* adenosine deaminase using cell-free protein synthesis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 271–276 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-271-276>

Введение. В качестве альтернативы генно-инженерной технологии получения хозяйственно важных белков и вирусоподобных частиц [1, 2], мембранных белков [3] и белков, содержащих неприродные аминокислоты [4, 5], ряд исследовательских групп использует бесклеточные системы протеинового синтеза, в которых при обеспечении оптимальных условий возможна наработка как простых протеинов, так и протеинов со сложной структурой с устранением всех барьеров

несовместимости для трансляции мРНК. Однако, несмотря на то что этот методический подход был предложен гораздо раньше, чем генно-инженерный, к детальному изучению возможностей его широкого практического использования приступили совсем недавно [6].

Реакционная смесь для бесклеточного синтеза белка (БСБ) – открытая система без такого физического барьера, как клеточная мембрана. Выход конечного продукта зависит от концентрации каждого компонента, которую можно варьировать в широких пределах, в отличие от ситуации *in vivo*. При этом конечная концентрация белка может достигать более 2 мг/мл.

Система БСБ предусматривает транскрипцию гена и трансляцию мРНК *in vitro* – в лизате клеток, в который вносят рекомбинантную ДНК, аминокислоты, нуклеотиды, кофакторы и АТФ-регенерирующую систему. Эндогенная генетическая информация (ДНК и мРНК клетки-хозяина) при этом удаляется [7].

Первоначально система БСБ была предложена как платформа для синтеза белков *in vitro* [8], а также в качестве инструмента для изучения механизмов репликации ДНК.

После ряда усовершенствований система БСБ стала более надежной, экономичной, универсальной и масштабируемой технологией для синтеза препаративных количеств различных белковых продуктов, в том числе вакцин [9], антител [10] и цитокинов [11]. Изучение системы БСБ дало толчок развитию новой дисциплины – бесклеточной метаболической инженерии [12]. В последние годы на основе системы БСБ были разработаны недорогие биосенсоры [13] и портативные устройства для диагностики различных заболеваний [14, 15].

Аденозиндезаминаза (АДаза; КФ 3.5.4.4) – фермент, играющий важную роль в метаболизме пуриновых нуклеозидов. Этот фермент осуществляет необратимую реакцию превращения аденозина в инозин путем замены NH_2 -группы в гетероциклическом основании нуклеозида на гидроксил. Помимо своего основного субстрата (аденозина) АДаза *E. coli* может использовать ряд других природных и модифицированных нуклеозидов – 2'-дезоксаденозин, 3'-дезоксаденозин, 2',3'-дидезоксиаденозин, 6-метиламинопуририбозид, 2,6-диаминопуририбозид [16]. Способность фермента осуществлять дезаминирование модифицированных пуриновых нуклеозидов делает его привлекательным для использования в химико-ферментативных схемах получения различных субстанций с потенциальной фармакологической активностью.

Цель настоящей работы – получение гомологичной АДазы при помощи системы бесклеточного синтеза белка на основе клеточного лизата *E. coli*.

Материалы и методы исследования. Источником гена АДазы (*add*; GenBank ID: 945851) служила ДНК *E. coli* K-12, выделенная из бактериальной биомассы с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Целевой фрагмент ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК и синтетических праймеров.

Подбор олигонуклеотидов осуществляли с помощью программного обеспечения UGENE 1.22 (UniPro, Россия) на основе нуклеотидных последовательностей гена АДазы: прямой *add*-F (5'-gtggtggtccacaacatgattgataccaccctgc-3') и обратной *add*-R (5'-ggtgatggtgatgctcttcgcggcgact-3'). На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET42mut [17].

Амплификацию осуществляли по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С), 30 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 55 °С; 30 с при 72 °С), финальная элонгация (75 с при 72 °С).

На втором этапе линейаризовали плазмиду pET42mut методом ПЦР с использованием Diamant-ДНК-полимеразы [18] и двух праймеров: прямого pET42mut-F (5'-catatgtatatctccttcttaagttaaasaaa ttatttctagag-3') и обратного pET42mut-R (5'-gagcatcaccatcaccaccaccaccactaattg-3'). Амплификацию вектора проводили по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С), 30 циклов амплификации (10 с при 98 °С, 15 с при 55 °С, 3 мин при 72 °С), финальная элонгация (3 мин и 25 с при 72 °С).

На третьем этапе объединяли линейаризованный вектор и целевой ген методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [19] по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С), 16 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 50 °С; 4 мин при 72 °С),

финальная элонгация (5 мин при 72 °С). На этом этапе в качестве матрицы и затравки были использованы полученные на первых двух этапах фрагменты в эквимольных количествах.

Синтезированным в ходе ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL (Novagen, США) с последующим их посевом на плотную селективную питательную среду Luria-Bertani (LB; 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl, 1 % триптона) с добавлением канамицина (100 мкг/мл).

Для определения наличия плазмид, содержащих целевые «вставки ДНК» часть одиночной колонии отбирали при помощи стерильного наконечника и вносили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-НСl (рН 8,3); 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 2 мМ MgCl₂; 0,02 % Твин-20; смесь четырех канонических дНТФ (каждый в концентрации 0,2 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Diamant [18]. В качестве ДНК-затравки использовали праймеры (по 10 пмоль) к последовательности промотора фага Т7 (прямой Т7р-Ф 5'-taatacgaactcaataggg-3') и к последовательности, кодирующей АДазу (обратный *add*-R). ПЦР проводили по следующей программе: этап начальной денатурации (2 мин при 94 °С), 25 циклов амплификации (30 с при 94 °С; 15 с при 55 °С; 1 мин при 72 °С), финальная элонгация (2 мин при 72 °С).

Клетки-трансформанты выращивали в LB-среде с добавлением канамицина с конечной концентрации 80 мкг/мл. Клетки, содержащие целевые плазмиды, культивировали в жидкой среде LB с последующим выделением плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.

Для синтеза АДазы использовали реакционную смесь (1,0 мл), содержащую 0,25 мл клеточного экстракта S30, 0,65 мл премикса, 5 000 ед. активности РНК-полимеразы бактериофага Т7, 500 нг полученной на предыдущем этапе работы плазмидной ДНК, которую затем инкубировали при 30 °С в течение 5–6 ч.

После этого определяли активность полученного фермента по скорости дезаминирования аденозина. Реакционную смесь, содержащую 20 мМ нуклеозида, 50 мМ Трис-НСl-буфера (рН 8,0) и фермент, инкубировали при 37 °С в течение от 30 мин до 1,5 ч. Из анализируемых образцов при помощи микрокапилляра отбирали аликвоты (5 мкл), которые наносили на хроматографические пластины для тонкослойной хроматографии Silufol-UV254.

Хроматографию проводили в системе растворителей хлороформ: метанол:аммиак в соотношении 10:10:2,5. Расположение пятен субстратов и продуктов реакции определяли в УФ-свете. Вещества элюировали 5 мл воды.

УФ-светопоглощение элюатов измеряли с помощью спектрофотометра при $\lambda = 255$ нм. Активность фермента определяли на начальной стадии реакции, когда выход продукта не превышал 10–15 % от максимального. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое обеспечивало образование 1 мкмоль продукта за 1 мин в соответствующих условиях реакции. Активность фермента выражали в ед/мл ферментного препарата.

Результаты и их обсуждение. На начальном этапе работы методом ПЦР амплифицировали ген *add*, кодирующий аминокислотную последовательность АДазы. Праймеры для ПЦР-амплификации гена подбирали таким образом, чтобы после их амплификации 5'- и 3'-окончания ПЦР-продуктов содержали нуклеотидные последовательности, комплементарные вектору рЕТ42mut.

Постановка горизонтального ДНК-электрофореза в агарозном геле после выделения и амплификации гена позволила получить нуклеотидную последовательность требуемого размера – 1000 п. н. (рис. 1).

На следующем этапе проводили линейризацию вектора рЕТ42mut с помощью ПЦР. Праймеры для линейризации вектора подбирали таким образом, чтобы при встраивании в плазмиду к 3'-окончанию целевого гена добавлялась последовательность нуклеотидов, которая обеспечивает

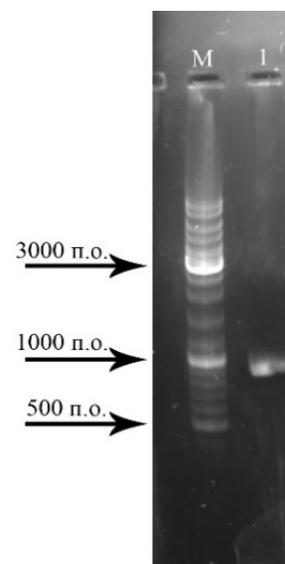


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *add* (1). М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Fig. 1. Electrophoregram of amplified fragments of gene *add* (1). M – DNA molecular size markers

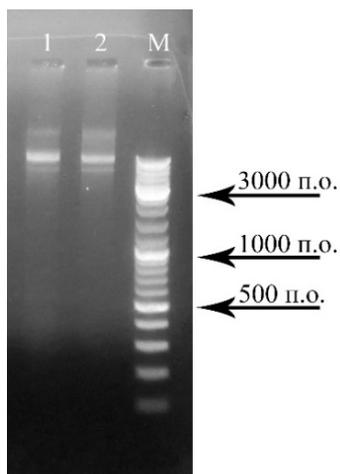


Рис. 2. Электрофореграмма плазмид (1 и 2), полученных при помощи щелочного лизиса клеток-трансформантов. М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Fig. 2. Electrophoregram of plasmids (1 and 2) obtained by alkaline lysis of transformed cells. M – DNA molecular size markers

наличие дополнительного октагистидинового олигопептида на С-конце целевого белка.

Затем проводили постановку ПП-ПЦР, которая, в отличие от стандартной ПЦР, требует наличия в векторе и вставке перекрывающихся комплементарных участков, включаемых на стадии клонирования целевых генов.

Как известно, при проведении ПП-ПЦР [19] вставка с вектором образуют смесь линейных конкатемеров, содержащих различное количество повторов «вставка–вектор». Данной смесью высокомолекулярных линейных молекул трансформируются клетки-реципиенты, в которых происходит формирование нескольких кольцевых молекул – плазмид, несущих в себе целевой ген.

Таким образом, ген *add*, кодирующий АДазу *E. coli*, был встроен в плазмиду рЕТ42mut. Полученной смесью ПП-ПЦР трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL. Из полученных трансформантов с помощью щелочного лизиса выделили плазмиды и проанализировали их при помощи электрофоретического разделения в 1 %-ном агарозном геле (рис. 2).

На следующем этапе работы проводили оценку эффективности синтеза АДазы в БСБ на основе S30 экстракта из *E. coli*. Конечная концентрация компонентов реакции включала: 100 мМ НЕРЕС-КОН (рН 8,0); 8 мМ Mg (CH₃COO)₂; 90 мМ KCH₃COO; 20 мМ фосфонолпируват калия; набор аминокислот (каждая в концентрации 1,3 мМ); 0,15 мг/мл фолиевой кислоты, каждый из четырех природных рибонуклеозидтрифосфатов в концентрации 1 мМ; 0,05 % NaN₃; 2 % полиэтиленгликоля 8000; 0,04 мг/мл пируваткиназы; 5,5 мкг/мл РНК-полимеразы фага T7; 0,3 мг/мл плазмидной ДНК, содержащей ген, кодирующий АДазу; 0,5 мг/мл суммарной тРНК (из *E. coli* MRE 600) и экстракт S30, полученный из лизата клеток *E. coli* (30 % от общего объема реакционной смеси).

Инкубацию проводили в течение 6 ч при 30 °С и умеренном перемешивании. Для контроля синтеза АДазы каждый час отбирали по 1 мкл для анализа ферментативной активности синтезируемого белка. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь БСБ с внесением вместо плазмидной ДНК соответствующего количества буферного раствора. Результаты представлены на рис. 3.

Выход АДазы в эксперименте, описанном выше, достиг 530 Ед/мл реакционной смеси. В плане сравнения следует отметить, что при проведенном ранее синтезе рекомбинантной АДазы

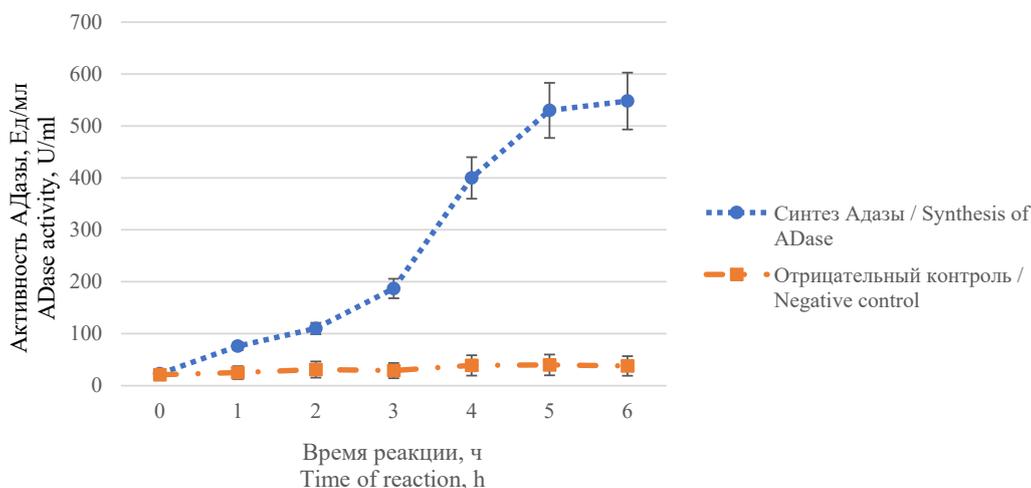


Рис. 3. Динамика накопления АДазы в реакционной смеси при синтезе ее в системе БСБ

Fig. 3. Dynamics of accumulation of adenosine deaminase in reaction mixture during cell-free protein synthesis

E. coli в цельноклеточной системе экспрессии максимальный выход ферментативной активности составлял 1,0 Ед/мл культуральной жидкости [20].

Заклучение. Впервые продемонстрирована возможность синтеза АДазы *E. coli* в системе БСБ. В частично оптимизированных условиях проведения процесса получен экспериментальный образец рекомбинантной АДазы с активностью 530 Ед/мл ферментного препарата.

По нашему мнению, синтез АДазы в системе БСБ может выступать в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию в ферментере.

Благодарности. Работа выполнена в рамках задания 3.13 Государственной программы научных исследований «Микробные биотехнологии», 2016–2020 гг.

Acknowledgements. The work was supported by the grant 3.13 from the Belarus State Research Program “Microbial Biotechnologies”, 2016–2020.

Список использованных источников

1. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis / M. T. Smith [et al.] // *Biotechnol. Progr.* – 2012. – Vol. 28, N 2. – P. 549–555. <https://doi.org/10.1002/btpr.744>
2. *De novo* expression and antibacterial potential of four lactoferricin peptides in cell-free protein synthesis system / N. El-Baky [et al.] // *Biotechnol. Rep.* – 2020. – Vol. 29. – Art. e00590. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00583>
3. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes / N. T. Hovijitra [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – Vol. 104, N 1. – P. 40–49. <https://doi.org/10.1002/bit.22385>
4. Patel, K. G. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide–alkyne click chemistry / K. G. Patel, J. R. Swartz // *Biocon. Chem.* – 2011. – Vol. 22, N 3. – P. 376–387. <https://doi.org/10.1021/bc100367u>
5. *In vitro* production of perdeuterated proteins in H₂O for biomolecular NRM studies / L. Imbert [et al.] // *Meth. Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 2199. – P. 127–149. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_8
6. On-chip automation of cell-free protein synthesis: new opportunities due to a novel reaction mode / V. Georgi [et al.] // *Lab. Chip.* – 2016. – Vol. 16, N 2. – P. 269–281. <https://doi.org/10.1039/C5LC00700C>
7. Cell-free protein synthesis: The transition from batch reactions to minimal cells and microfluidic devices / M. H. Ayoubi-Joshaghani [et al.] // *Biotechnol. Bioengin.* – 2020. – Vol. 117, N 4. – P. 1204–1229. <https://doi.org/10.1002/bit.27248>
8. Zubay, G. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems / G. Zubay // *Annu. Rev. Genet.* – 1973. – Vol. 7. – P. 267–287. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.07.120173.001411>
9. Assessing sequence plasticity of a virus-like nanoparticle by evolution toward a versatile scaffold for vaccines and drug delivery / Y. Lu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – Vol. 112. – P. 12360–12365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510533112>
10. Production of bispecific antibodies in “knobs-into holes” using a cell-free expression system / Y. Xu [et al.] // *mAbs.* – 2015. – Vol. 7, N 1. – P. 231–242. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989013>
11. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production a new approach for shortening protein production development timelines / J. F. Zawada [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2011. – Vol. 108, N 7. – P. 1570–1578. <https://doi.org/10.1002/bit.23103>
12. Guo, W. Mini-review: in vitro metabolic engineering for biomanufacturing of high-value products / W. Guo, J. Sheng, X. Feng // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* – 2017. – Vol. 15. – P. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.006>
13. A cell-free protein synthesis approach to biosensing hTR β -specific endocrine disruptors / A. S. Salehi [et al.] // *Anal. Chem.* – 2017. – Vol. 89, N 6. – P. 3395–3401. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04034>
14. Paper-based synthetic gene networks / K. Pardee [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 159, N 4. – P. 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.004>
15. Tonooka, T. Microfluidic device with integrated freeze-dried cell-free protein synthesis system for small-volume biosensing / T. Tonooka // *Micromachines.* – 2020. – Vol. 12. – P. 27–37. <https://doi.org/10.3390/mi12010027>
16. Enzymatic synthesis of 2'-deoxyguanosine with nucleoside deoxyribosyltransferase-II / K. Okuyama [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2003. – Vol. 67, N 5. – P. 989–995. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.989>
17. Казловский, И. С. Модификация экспрессионной рЕТ-системы для использования в бесклеточном синтезе белка / И. С. Казловский, А. Н. Рымко, А. И. Зинченко // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2018. – Т. 10. – С. 69–78.
18. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction / A. S. Korovashkina [et al.] // *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development* / eds. : S. D. Varfolomeev, G. E. Zaikov, L. P. Krylova. – New York, 2012. – P. 1–6.
19. You, C. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* / C. You, X. Z. Zhang, Y. H. P. Zhang // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 78, N 5. – P. 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/AEM.07105-11>
20. Квач, С. В. Оптимизация условий экспрессии штамма-суперпродукента аденозиндеаминазы *Escherichia coli* / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко // *Динамика исследований – 2008: материалы IV Междунар. науч.-практ. конф., София, 16–31 июля 2008 г. – София, 2008. – С. 26–29.*

References

1. Smith M. T., Varner C. T., Bush D. B., Bundy B. C. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis. *Biotechnology Progress*, 2012, vol. 28, no. 2, pp. 549–555. <https://doi.org/10.1002/btpr.744>

2. El-Baky N., Elkhawaga M., Abdelkhalek E., Sharaf M. M., Redwan E. M., Kholef H. R. *De novo* expression and antibacterial potential of four lactoferricin peptides in cell-free protein synthesis system. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 29, art. e00590. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00583>
3. Hovijitra N. T., Wu J. J., Peaker B., Swartz J. R. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, vol. 104, no. 1, pp. 40–49. <https://doi.org/10.1002/bit.22385>
4. Patel K. G., Swartz J. R. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide–alkyne click chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 2011, vol. 22, no. 3, pp. 376–387. <https://doi.org/10.1021/bc100367u>
5. Imbert L., Lenoir-Capello R., Crublet E., Vallet A., Awad R., Ayala I. [et al.]. *In vitro* production of perdeuterated proteins in H₂O for biomolecular NRM studies. *Methods in Molecular Biology*, 2021, vol. 2199, pp. 127–149. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_8
6. Georgi V., Georgi L., Blechert M., Bergmeister M., Zwanzig M., Wustenhagen D. A., Bier F. F., Junga E., Kubick S. On-chip automation of cell-free protein synthesis: new opportunities due to a novel reaction mode. *Lab on a Chip*, 2016, vol. 16, no. 2, pp. 269–281. <https://doi.org/10.1039/C5LC00700C>
7. Ayoubi-Joshaghani M. H., Dianat-Moghadam H., Seidi K., Jahanban-Esfahalan A., Zare P., Jahanban-Esfahlan R. Cell-free protein synthesis: The transition from batch reactions to minimal cells and microfluidic devices. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, vol. 117, no. 4, pp. 1204–1229. <https://doi.org/10.1002/bit.27248>
8. Zubay G. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. *Annual Review of Genetics*, 1973, vol. 7, pp. 267–287. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.07.120173.001411>
9. Lu Y., Chan W., Ko B., VanLang C., Swartz J. R. Assessing sequence plasticity of a virus-like nanoparticle by evolution toward a versatile scaffold for vaccines and drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, vol. 112, no. 40, pp. 12360–12365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510533112>
10. Xu Y., Lee J., Tran C., Heibeck T., Wang W., Yang J. [et al.]. Production of bispecific antibodies in “knobs-into holes” using a cell-free expression system. *mAbs*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 231–242. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989013>
11. Zawada J. F., Yin G., Steiner A. R., Yang J., Naresh A., Roy S. M., Gold D. S., Heinsohn H. G., Murray C. J. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, vol. 108, no. 7, pp. 1570–1578. <https://doi.org/10.1002/bit.23103>
12. Guo W., Sheng J., Feng X. Mini-review: *in vitro* metabolic engineering for biomanufacturing of high-value products. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2017, vol. 15, pp. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.006>
13. Salehi A. S., Shakalli Tang M. J., Smith M. T., Hunt J. M., Law R. A., Wood D. W., Bundy B. C. A cell-free protein synthesis approach to biosensing hTRβ-specific endocrine disruptors. *Analytical Chemistry*, 2017, vol. 89, no. 6, pp. 3395–3401. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04034>
14. Pardee K., Green A., Ferrante T., Cameron D. E., DaleyKeyser A., Yin P., Collins J. J. Paper-based synthetic gene networks. *Cell*, 2014, vol. 159, no. 4, pp. 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.004>
15. Tonooka T. Microfluidic device with integrated freeze-dried cell-free protein synthesis system for small-volume biosensing. *Micromachines*, 2020, vol. 12, pp. 27–37. <https://doi.org/10.3390/mi12010027>
16. Okuyama K., Shibuya S., Hamamoto T., Noguchi T. Enzymatic synthesis of 2'-deoxyguanosine with nucleoside deoxyribosyltransferase-II. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, vol. 67, no. 5, pp. 989–995. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.989>
17. Kazlovskii I. S., Rymko A. N., Zinchenko A. I. Modification of expression system of pET for using in cell-free protein synthesis. *Mikrobnaya biotekhnologiya: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 10* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects: a collection of scientific papers. Vol. 10]. Minsk, 2018, pp. 69–78 (in Russian).
18. Korovashkina A. S., Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Zinchenko A. I. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction. *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development*. New York, 2012, pp. 1–6.
19. You C., Zhang X. Z., Zhang Y. H. P. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, vol. 78, no. 5, pp. 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/AEM.07105-11>
20. Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Zinchenko A. I. Optimization of expression conditions of the strain-superproducent adenosine deaminase *Escherichia coli*. *Dinamika issledovaniy – 2008: materialy IV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Sofiya, 16–31 iyulya 2008 goda)* [Dynamics of research – 2008: Proceedings of the IV International scientific and practical conference (Sofia, July 16–31, 2008)]. Sofia, 2008, pp. 26–29 (in Russian).

Информация об авторах

Казловский Илья Сергеевич – магистр биол. наук, науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: leonardo_139@mail.ru

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Illia S. Kazlouski – Master of Biology, Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leonardo_139@mail.ru

Anatoli I. Zinchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by