

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01102

合成生物学与微生物遗传物质的重构

梁泉峰^{1,2}, 王倩², 祁庆生^{1,2}

1 山东大学微生物国家技术重点实验室, 济南 250100;

2 山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100

摘要: 作为一门新兴学科的合成生物学已经展现出巨大的科学价值和应用前景。近年来已经发表了多篇综述文章, 从不同角度对合成生物学进行了总结和论述。文章首次对合成生物学和微生物遗传学之间的关系进行了阐述, 同时介绍了合成生物学在微生物遗传物质的重构方面最近的研究进展, 包括微生物遗传物质的合成、设计和精简, 遗传元件的标准化和遗传线路的模块化。也探讨了合成生物学与微生物遗传工程的关系。

关键词: 合成生物学; 遗传学; 微生物; 遗传物质; 微生物遗传工程

Synthetic biology and rearrangements of microbial genetic material

LIANG Quan-Feng^{1,2}, WANG Qian², QI Qing-Sheng^{1,2}

1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: As an emerging discipline, synthetic biology has shown great scientific values and application prospects. Although there have been many reviews of various aspects on synthetic biology over the last years, this article, for the first time, attempted to discuss the relationship and difference between microbial genetics and synthetic biology. We summarized the recent development of synthetic biology in rearranging microbial genetic materials, including synthesis, design and reduction of genetic materials, standardization of genetic parts and modularization of genetic circuits. The relationship between synthetic biology and microbial genetic engineering was also discussed in the paper.

Keywords: synthetic biology; genetics; microorganism; genetic material; microbial genetic engineering

遗传学^[1]作为一门具有悠久历史的学科, 它的研究范围包括遗传物质的本质、遗传物质的传递和遗传信息的实现 3 个方面。遗传学是一门涉及生命起源和生物进化的理论科学, 同时也是一门密切联系生产实际的基础科学, 直接指导动植物和微生物

育种(遗传工程)。微生物遗传作为遗传学的一个重要分支, 在遗传学的发展历史上起着承上启下的关键作用。

合成生物学作为一门新兴的交叉学科, 致力于工程化自组装细胞装置, 制作崭新的遗传系统, 推

收稿日期: 2011-04-24; 修回日期: 2011-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30870022)和国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2011CB707405)资助

作者简介: 梁泉峰, 博士, 副教授, 研究方向: 代谢工程和合成生物学。Tel: 0531-88362897; E-mail: liangquanfeng@sdu.edu.cn

通讯作者: 祁庆生, 博士, 教授, 研究方向: 代谢工程和合成生物学。E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

网络出版时间: 2011-8-31 9:12:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110831.0912.002.html>

进遗传基因编码功能以及生命起源等方面的研究。对于设计人员来说, 合成生物学提供了验证基因组编码自然生物系统可以被“重写”这一假说的手段, 也提供了制造可以有效替代某些自然生物系统的工程化代用品的手段。对于工程师而言, 在以往遗传工程的基础上, 合成生物学从头设计并构建新的遗传组件、设备和系统, 或对现有的、天然的生物系统进行重新设计和改造, 以达到利用工程化的遗传系统或生物模型来处理信息、合成化合物、制造材料、生产能源、提供食物、保持和增强人类健康以及改善环境等目的^[2]。因此, 全面理解合成生物学的内涵, 必须从其科学理论本质及技术工程本质两个方面入手, 合成生物学的科学理论本质是用“合成”的理念和策略, 来研究生物和生命系统运行的规律; 合成生物学的工程技术的本质是按设计好的蓝图重新组装分子元件, 并转入细胞, 使这些工程化的细胞执行新的功能^[3]。与分子遗传学的发展历程类似, 由于微生物结构简单和分子改造技术成熟, 目前合成生物学研究的对象以微生物为主。

综上所述, 我们认为新兴的合成生物学与历史悠久的遗传学在研究目标和对象上密不可分, 都兼具着阐明生命起源和遗传规律的科学本质和改善人类环境及健康, 生产食物及能源的技术工程本质。但是合成生物学与遗传学从研究思路和研究手段上又大不相同。以下我们将就合成生物学与微生物遗传学的关系进行阐述, 并对合成生物学在遗传物质的重构以及对微生物遗传工程的发展等方面的最新进展加以介绍。

1 合成生物学的终极目标和对遗传学研究思维的革命

合成生物学的领军科学家之一——麻省理工 Endy 博士在接受 *Scientific American* 杂志采访中预言, 合成生物学最终的目标是将可通用的遗传组件进行组装, 创造出“人造生命”^[4]。

2007 年美国 Venter 领导的合成生物学研究团队把微生物 *Mycoplasma mycoides* 的基因组用 *Mycoplasma capricolum* 的天然基因组取代, 产生的融合体在基因型和表型方面都表现为 *M. capricolum*^[5]。Ball^[6]在 *Nature* 中以“合成生物学: 设计生命”

(Synthetic Biology, Design for Life) 为题, 对这项研究成果给予高度评价, 认为人类已经进入了“为了某个实用目的而进行全基因组工程改造”的时代。在前人研究基础上, Venter 研究团队^[7]于 2010 年 5 月在 *Science* 上发表了人工合成细胞的里程碑式研究成果。他们完全用化学方法合成了一个大小为 1.08 MB 的 *M. mycoides* 基因组, 当把这个 1.08 MB 的基因组导入到 *M. capricolum* 受体时, *M. capricolum* 受体逐渐长成了 *M. mycoides*。该 *M. mycoides* 细胞由完全化学合成的基因组所控制, 并以新的胞内控制回路来支配该单细胞的生命活动, 能在实验室条件下正常生长。

事实上, 此前化学合成病毒基因组构建依赖宿主进行复制的病毒已经获得成功。DNA 和 RNA 病毒具有很小的基因组 (8~30 kb) 和相对简单的功能, 更容易合成。到目前为止, 脊髓灰质炎病毒、‘Spanish’ 流感病毒、HIVcpz 病毒、冠状病毒和 X174 病毒的全基因组已经合成并且证明有感染性^[8]。而且化学合成方法可以大范围的改变基因组以减弱病毒的致病性。经密码子优化后的病毒株在表型上与野生姊妹株相同, 但由于多个稀有密码子的选用而不能在正常的宿主中复制^[8], 因此化学合成病毒基因组在疫苗生产领域有广泛的应用前景。由于上述人工合成的病毒没有自我复制能力, 2010 年 Venter 研究组人工合成 *M. mycoides* 细胞的工作才被大家公认为是实现合成生物学终极目标——创造“人造生命”的奠基之作。

虽然合成生物学的研究内容主要是对遗传物质和遗传元件的人工设计、合成和组装, 其研究基础和内容与遗传学密不可分。但是合成生物学的科学思维自诞生之日起就与包括遗传学在内的传统自然科学截然不同。

遗传学发展经历了细胞遗传学时期、微生物遗传学时期和分子遗传学 3 个时期。拉马克和达尔文通过观察生物体的遗传变异的表象开拓了遗传学的发端, DNA 双螺旋结构的揭示开辟了分子遗传学研究, 遗传学遵循了一个从整体水平到细胞水平再到分子水平, 由宏观到微观, 由染色体到基因, 逐步深入到研究遗传物质结构和功能的发展规律。合成生物学则采取另外一种思路, 首先提出科学目标,

在合成过程中,发现问题,解决问题,反复循环,得到“活”的系统,从根本上完成创造生命的科学终极目标,与此同时人们对生命体的遗传系统认识也得到了最终的验证。也就是为什么 Venter 团队合成首个细胞的研究成果,被认为是合成生物学上迄今为止最重要的里程碑的原因之一。因此我们可以说合成生物学研究理念是对遗传学的科学思维的革命。

2 合成生物学对微生物遗传物质的合成、设计和精简

合成生物学对遗传物质的人工设计和合成必须建立在对遗传信息充分了解的基础上。20 世纪 90 年代开始实施的人类基因组计划,使人们能够全面认识一个生命系统的全部遗传密码信息,由此产生了一门新的学科—基因组学。而正是基因组学的诞生为遗传学提供了进一步发展的平台,同时为合成生物学真正意义上的诞生奠定了基础。从此,遗传学可以分析生物体基因组的全部核苷酸排列顺序,揭示其所携带的全部遗传信息,并阐明遗传信息表达的规律及其最终生物学效应。而基因组学和转录组学、蛋白质组学以及代谢组学所积累的天文数量级生物学数据,也为合成生物学的快速发展奠定了基础。这其中微生物因其基因组信息相对简单和基因操作技术非常成熟,已成为合成生物学对遗传物质合成和改造研究的模式生物。而这种合成和改造是在 DNA 和基因组两个水平上进行的。

2.1 遗传物质 DNA 的合成

当自然界存在的 DNA 不具有期望属性时,合成 DNA 乃至全基因组有时是获得期望生物系统的唯一方法。合成 DNA 可以用来重设计目标基因序列、编码区域或者调控信号(报告基因、阻遏子、激活子、终止子、核糖体结合位点和启动子等)以及为适应特殊宿主或模拟生物体而改变密码子的用法。人工合成基因允许高效构建相关的在特殊区域有所改变的基因簇;允许目标基因的柔性设计而不需常规基因重组或克隆所需的中间步骤;允许选择只包括期望功能和途径的人工合成基因,以简化或切断生物进化作用所带来的影响;允许用户插入任意期望的模块,具有可扩展性。如果把合成基因组设计成只有

在实验室特殊条件和培养基中才能存活的形式,则人工合成基因更具有安全性。

不同于传统的重组 DNA 技术(DNA 克隆),化学合成 DNA 能够使研究者合理设计任何新的 DNA 序列。商业化的 DNA 合成能够很容易的合成几十 kb 的 DNA 片段^[9]。这种手段使我们方便快捷的合成基因,去除限制性酶切位点或者不想要的 RNA 二级结构和优化密码子来表达基因。DNA 合成已经用于许多的合成生物学的应用中,如创造人工基因组和定制生物合成途径。从 1970 到 2008 年, DNA 合成片段的长度已经从 75 bp 增加到 582 970 bp^[10]。目前,最长的 DNA 合成记录是 Venter 研究组 583 kb 的 *Mycoplasma genitalium* 基因组,它的合成是由 101 段(每段长 5~6 kb)的 DNA 片段构建完成^[11]。具体合成过程分为两步:第一步为由多步体外酶催化重组构建了 25 个有重叠序列的大片段 DNA;第二步利用酵母体内的重组机制完成合成最终的基因组^[12]。另外,Shao 等^[13]发展了一个简单的 DNA 装配技术来合成一个生化途径。该生化途径的 8 个基因(总长 19 kb)在酵母中一步装配完成,这个重组菌能够利用木糖产生玉米黄质。这种自下而上的策略,大大提高了遗传工程的适用性和灵活性。

哈佛大学的 Church 研究组正在发展一种新的、基于微芯片的高并行 DNA 合成方法,并已取得突破性进展。基于新的微型化并行合成的 DNA 合成技术能够使基因合成成本在现有基础上降低数百倍。他们利用这种并行合成技术,成功合成了全长为 14.6 kb、编码 21 个基因的 DNA 序列。通过合成重新设计的 DNA 序列,优化密码子的使用频率,部分蛋白的体外表达效率提高了数倍^[14]。最近,该研究组在上述研究成果的基础上开发了一个高度平行的微量合成方法,称为兆级克隆(Megacloning),可以把微阵列方法合成的 DNA 的错误率降低 500 倍^[15]。同时,他们还用高保真的 DNA 合成芯片,采用特殊的选择性寡聚核苷酸库,优化的基因组装上纠错酶组装了 47 个基因,包括 42 个治疗性抗体序列(35 kb DNA)。这些组装件来源于一个含有 13 000 个寡聚核苷酸库,它们编码的 2.5 Mb DNA 序列比以前的相关报道大了 50 倍^[16]。

2.2 非天然核酸的合成

合成生物学改造和合成遗传物质DNA的另一个方法是利用向细胞DNA中掺入非天然的核酸,来发展人工遗传系统,支持人工生命形式^[17]。在遗传的中心法则中DNA是遗传信息的储存分子,自然界赋予A、T、C、G组成的三联密码来体现生命的所有的复杂性。其中有3个基本设计特征(参数):(1)所选择的核苷酸;(2)核苷酸的数目;(3)三联体密码。合成非天然核酸的最直接的目的是加强多聚核苷酸的稳定性。DNA的磷酸二酯骨架是酶裂解攻击的位点,利用其他基团,例如硫代磷酸^[18]、硼烷磷酸^[19]和膦酸^[20],来替换核苷酸上的磷酸基团,可以将最易被攻击的位点去除。合成非天然核酸的另一个直接目的是利用非天然核苷酸扩展碱基对的数目,提高遗传信息的容量。研究发现,工程化的碱基对(例如 isoC:isoG^[21]和 Z:P^[22])能与天然DNA聚合酶很好的相容。

2.3 基因组工程(Genome engineering)

基因组工程是合成生物学从微生物基因组水平改造遗传物质的一个重要手段^[23]。大片段DNA的合成和操作技术的不断提高使基因组工程进入了一个新的时代。如今,我们可以通过各种手段对基因组进行编辑来达到不同的目的。例如从头合成基因组^[11],消除不稳定DNA片段^[24],一个基因组与另一个基因组的共存^[25],改组基因组组分^[26],全基因组重排^[27]等。最近,一个新的强有力的手段——多元自动基因组工程(Multiplex automated genome engineering, MAGE)被用来大规模的设计和进化细胞^[28]。在这种方法中,大量兼并(degenerate)寡核苷酸连续不断被引入到一个细胞群落的细胞中,利用同源交换产生跨基因组的序列多样性。整个过程能自动、便利快速和连续的产生一系列多样的遗传改变,例如错配、插入和删除。由于这种方法可以在单个细胞中或细胞群落的细胞间,同时作用于染色体上的许多位点,MAGE可以用来产生一个大范围的基因组多样性组合。因此基因组工程在全细胞水平上具有非常重要的应用价值。

2.4 微生物基因组的精简

合成生物学在微生物基因组水平的改造的另一

个重要方法是对微生物基因组的精简。其中最重要的方向是最小基因组的构建,即将研究的功能对象缩小化,希望从最小的生命入手,研究其必需的生命组成,进而模拟、复制、改造这些生命体来阐明生命的奥秘。

Venter研究团队将已经很小的*M. genitalium*基因组从482个基因精简到382个。但是这些必需基因的数目仍多于预期,其中有大约100个未知功能基因^[29],这说明我们在基因组精简和基因功能的验证上还有很长的路要走。在模式生物大肠杆菌的基因组精简研究方面,Posfai等^[24]用合成生物学的方法,通过有计划地精确地删除,使大肠杆菌基因组减少高达15%并仍然能够生长。超过700个非必需基因、可移动DNA元件和隐藏性致病基因被删除。令人惊讶的是,这一小基因组的大肠杆菌不但在生长状况和蛋白合成方面和原始菌株不相上下。基因组的精简反而导致菌株获得了一些有益的特性,例如高效的电转化率,准确的复制重组基因和稳定的质粒复制。精简后的基因组还有超过3600个基因,其功能仍然十分复杂无法完全确定。这种新方法使得对基因组进行大规模合理改变成为可能,也是设计新生命的起点。除了大肠杆菌,枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)基因组精简研究都取得了进展。已经完成的部分小基因组研究见表1。

微生物基因组精简的另一个应用方面,是通过人工设计和优化,合理的选择基因组遗传信息,删减遗传冗余而创造具有简化的遗传背景的宿主细胞。细胞是一个复杂的系统,影响外源基因或外源代谢途径高效稳定表达的因素很多。大多数宿主细胞具有抑制外源基因表达以减少外源DNA遗传负担的能力^[24]。这样就需要对宿主细胞的相关基因进行一系列合理精简,来构建使外源基因或代谢途径稳定高效表达的菌株平台。本实验室为了构建一个大肠杆菌的好氧发酵平台,删除了主要副产物乙酸的代谢途径基因以及相关抑制基因和葡萄糖转运蛋白编码基因。将外源的聚羟基丁酸酯(PHB)合成途径转入该好氧发酵平台菌株后,构建成功的大肠杆菌重组菌PHB产量提高了100%,乙酸积累下降了90%^[30]。陈国强研究组删除了beta-氧化途径的小基因组恶臭假单胞菌能够合成一系列均聚的聚羟基脂

表 1 微生物小基因组研究进展(引自文献[33]并加以补充)

菌株	删除长度	特性	文献
<i>E. coli</i>			
MDS42	663.3 kb(14.30%)	高的电转效率	[24]
MGF-01	1.03 Mb(22%)	增加苏氨酸产量(2 倍)	[34]
△16	1.38 Mb (29.7%)	生长速率减慢	[35]
<i>B. subtilis</i>			
MGB874	873.5 kb(20.7%)	增加胞外纤维素酶产量(1.8 倍), 蛋白酶产量(2 倍)	[36]
<i>S. cerevisiae</i>			
	531.5 kb(5%)	增加乙醇产量(1.8 倍), 甘油产量(2 倍)	[37]
<i>S. avermitilis</i>			
	1.67 Mb (18.54%)	增加链霉素产量(4 倍), 头霉素 C 产量(2 倍)	[38]

肪酸酯(PHA)材料,表明基因减少的恶臭假单胞菌生长不受影响,但合成PHA的能力成为可控[31]。Lee等[32]在详细分析了*Mannheimia succiniciproducens*这株菌代谢途径的基础上,在其基因组上作出了许多修改,删除了与琥珀酸(1, 4-丁二酸)合成无关的基因,合成出一条高效生产PBS单体 1, 4-丁二酸的新型路径。

由简单到复杂,从构建维持最小生命体的基因组和创造具有简化的遗传背景宿主细胞入手来研究生命体和构建能够高效稳定执行新功能的底盘细胞,是一种在根本上解决问题的研究思路,我们可以预见,该领域的研究成果对生命的起源、组装等根本性问题将具有极大的参考价值,同时对生物基产品和能源的工业化生产也将起到巨大的推动作用。

3 遗传功能元件(Genetic parts)标准化

合成生物学研究除了对遗传物质的合成和改造外,还致力于工程化的设计和构建新的遗传组件、遗传线路和模块。实现这一目标的第一步就是对遗传功能元件的标准化。通过建立各种可通用的标准化的遗传元件,利用元件组装使宿主有新的功能,最终达到建立复杂元件系统,甚至组装生命的目的。合成生物学的遗传元件通常是指一段有功能的DNA序列(包括启动子、核糖开关、终止子、蛋白编码序列和其他功能片段)。遗传元件的标准化的过程,包括对元件的详细描述(如序列、特性和获取途径等),按一定的标准进行质量控制测试,甚至引入统一的酶切位点以简化后续构建工作(BioBrick),从而使遗传元件具有特征明显,功能明确且能与其他元件进行自由组装等特性[39]。

2003 年,合成生物学委员会及标准生物元件注

册处在麻省理工成立。同年麻省理工建立了标准化遗传元件库 (Registry of Standard Biological Parts, www.partsregistry.org), 这个遗传元件库的积累速度很快,目前约有 5 000 多个元器件。2004 年第一届国际遗传工程机械大赛(iGEM)在麻省理工举行, iGEM 竞赛的核心是关于标准生物零件的观念:生物零件是详细明确指定的,而且在其他子系统及整个系统中工作得非常好。一旦这些零件的参数被确定及标准化,则生物系统的模拟、设计就会变得更容易更可靠。

目前标准化的遗传元件的一个重要应用领域是,利用标准化的启动子和核糖开关等遗传元件来精确控制遗传线路中的多基因表达。启动子工程[40]可以构建出不同强度的启动子为合成生物学研究所应用。保持调控蛋白结合位点序列不变,通过改造启动子-10区和-35区的序列,以及其间的16个碱基即可以构建一系列具有不同启动强度的启动子[41-44]。2011年Davis等[45]在*Nucleic Acids Research*上发表了一种新的构建不同强度启动子模块的方法,他们先在-10区和-35区两侧加上“绝缘(Insulated)”序列来隔绝激活或抑制因子结合位点,然后通过启动子随机突变文库,构建了一系列不同强度的组成型启动子。这些绝缘型启动子盒(Insulated promoter cassettes)的长度可以从-105到+5区域,包括了主要的转录因子结合位点和大部分影响转录起始和启动子泄漏的序列范围。这种绝缘型启动子模块在各种遗传环境下更容易控制和预测。该研究所得到的启动子元件已经在麻省理工的标准化遗传元件库注册。核糖开关是一种在蛋白质翻译水平上调控一系列基础代谢途径的RNA调控元件。近年来发展起来的体外筛选技术(Systematic evolution of ligands by ex-

ponential enrichment, SELEX)可以在体外筛选具有高亲和力和专一性的小分子核酸适体^[46-49]。由于RNA分子结构功能域有很强的模块特点,应用不同的适体和基因表达调控结构域,可以构建对特定配体小分子依赖的表达调控核糖开关^[50]。核糖开关的调控是配体浓度依赖模式,因此可以进行定量调控^[51,52]。同启动子相比,核糖开关可以根据细胞代谢情况精确调节基因表达和优化遗传线路。另外,原核操纵子基因间的序列可以直接影响mRNA的加工和稳定性,通过改变基因间的区域可以调控操纵子内多基因的表达水平^[44,53]。上述的标准化的遗传元件较传统的分子生物学工具调控基因表达水平的方式更加精确。并且可以模块化的使用在遗传线路的构建中,实现多基因差异水平的调控表达^[54]。同时,由于合成生物学中遗传元件详细的物理、生物学特征描述,这些遗传元件的使用大大简化了遗传线路的构建和调控。

4 遗传线路(Genetic circuit)模块化

当遗传功能元件的参数被确定及标准化,生物模块(module)的设计与构建就会变得容易而可靠。从启动子、核糖体结合位点、转录抑制子等基本元件到生物开关、基因簇、脉冲发生器、时间延迟环路、生物振荡器、三维空间图案结构及逻辑公式等生物模块的构建,为下一步人工设计和构建模块化的遗传线路创造了条件^[55,56]。

遗传线路的研究最早可追溯到 Jacob 和 Monod 关于半乳糖操纵子模型的遗传学经典工作。而合成生物学通过设计非天然的遗传线路,可以深刻了解经过自然进化的天然遗传线路的运转机制。输出的遗传线路可以被以下 3 步的任一步控制:转录前,翻译前和翻译后。例如,利用翻译后修饰控制活性比控制转录响应时间要短的多。由于操作的简易,转录调控已经成为最常用的控制模式。转录遗传线路典型的构建方式是用化学方法连接多个启动子,抑制子和激活子。

早期合成生物学遗传线路的研究是从构建了基础的线路元件开始,如被认为是合成生物学诞生的遗传开关和遗传振荡子的构建成功^[57-60],以及后来

的更高级的遗传振荡器的成功制造^[61,62]。而最具代表性的研究是Levskaya 等^[63]创造的具有图像处理功能的遗传线路,他们设计了一个细菌系统,可以由红光触发该系统在不同状态之间开关。该系统由一种合成的传感酶组成,使得细菌的菌苔能像生物胶片一样起作用,当接受一类光投射到菌体后,可产生高清晰度的二维化学图像。这种具有图像处理功能的新型遗传线路的创造,证明了合成生物学的巨大潜力及可应用性。

目前合成生物学研究的重点是力图发展更复杂的遗传功能线路,例如数模转换器、模(拟)数(字)转换器、定时器、自适应学习网络和决策线路(Decision-making circuits)^[64]。我们以模数转换器为例说明这些下一代遗传线路的功用。模数转换器潜在的应用是噪声控制和全细胞传感器。当我们利用细胞来检测分子,我们需要的不是“X与Y相关”的,而是一个“是或否”的答案。例如,毒素是否超过危险的阈值,我们更希望一个装置当高于危险阈值时,能够由无色变成红色,而随着毒素浓度的增加颜色由无色变成粉色再到红色。在一个数字系统,一个变化只有两种状态,相对模拟系统有更强的抗噪声的能力。但是,自然界固有的是模拟状态。这样我们就需要一个模数转换器来转换这两种系统^[64]。另一方面,构建遗传线路也能让研究者理解自然界遗传线路的特性。最近, Cagatay 等^[65]探究自然界在功能相当的线路中为什么选择某一特定的遗传线路的问题时,将人工构建的替代线路与野生型比较,他们发现野生型的线路的噪声更大(更多的波动)。进一步的实验证实人工替代线路更精确,在特定的环境中表现出更好的功能。而噪声较大的野生型遗传线路能在更广泛的环境中起作用。因此在一个类似自然界的变化的环境下,往往选择的是噪声和适应性更强的遗传线路,而不是更精确的线路。

标准化的遗传功能元件和模块化的遗传线路方面的研究成果,将进一步设计和构建崭新的生物系统及创造真正意义上的“人造生命”打下坚实的基础。

5 合成生物学是对微生物遗传工程的发展

微生物遗传(基因)工程和合成生物学的应用目

标都是解决生物医药、环境能源和生物材料等重大生物技术问题。但是合成生物学与遗传工程在内涵上是有区别的,遗传工程和合成生物学虽然都可以利用天然或经修饰的遗传元件或遗传线路来构建工程化系统,但是传统遗传工程所使用的遗传元件和线路没有得到很好的定义或标准化,而合成生物学是组装各种标准化的遗传元件和模块来建立人工生物体系,让它们能像电路一样在生物体内运行,使生物体能按预想的方式完成各种生物学功能。另一方面,尽管遗传工程的研究已经不是简单的过量表达特定的蛋白,而发展到对途径和网络水平的改造,但是遗传工程往往是针对宿主细胞已经具有的遗传代谢途径进行改造。而合成生物学则是在宿主细胞不具有最终产品代谢机制的情况下,通过人为的设计合成相关酶系并异源表达,构建出一个全新的完整的合成途径。同时需要解决的问题还包括平衡启动子的强度,酶的协同表达以及与自然代谢的协调^[66]。

国内学者已经发表了多篇有关合成生物学应用的综述^[3,67,68],在这里我们只举两方面的例子来说明合成生物学对传统遗传工程技术的发展。在人工设计合成新的代谢途径方面,加州大学的 Keasling 教授有关抗疟药物青蒿素微生物工业化合成的研究工作堪称合成生物学应用研究的典范之作。他们分别使用大肠杆菌和酵母菌为宿主,通过 DNA 的合成、来自细菌、酵母及植物(青蒿)等多种酶及代谢途径的组装、精密调控等,对有关代谢途径作了重新设计,解决了天然或非天然代谢物大量积累对寄主的毒性问题。对于大肠杆菌,通过植物青蒿素的 amorphadiene 合酶(ADS)密码子优化、共表达编码 5-磷酸脱氧木酮糖途径的 SOE4 操纵子以及引入异源的酵母菌甲羟戊酸途径等途径,提高了青蒿素前体 amorphadiene 的产量^[69];对于酵母菌,主要工作包括改造 FPP 合成途径,引入植物青蒿的 amorphadiene 合酶(ADS)基因,克隆青蒿类植物转化为青蒿酸的细胞色素 P450 氧化还原酶等。改造后的菌株使青蒿酸的合成能力大大提高^[70]。为表彰 Keasling 的杰出成就,美国《发现》杂志评选其为 2006 年度最有影响的科学家。另外,我们实验室将真养产碱杆菌中的聚羟基丁酸酯(PHB)

合成途径转入大肠杆菌中,同时对大肠杆菌本身的琥珀酸代谢途径进行改造和优化,重组菌中的 PHB 积累不仅能够促进琥珀酸的合成,而且能够降低丙酮酸和乙酸的分泌。该重组大肠杆菌的 PHB 和琥珀酸的产量达到 4.95 g/L 和 24.6 g/L, PHB 含量占细胞干重的 41.3 wt %。从而在大肠杆菌中发展了一个同时生产琥珀酸和 PHB 的联产模式^[71]。合成生物学应用研究的另一方面,是在协调细胞同步代谢方面的巨大的应用潜力^[72]。2010 年, Danino 等^[73]应用合成生物学的理念成功构建一个群体同步遗传时钟的研究成果,他们基于细菌群体感应的机制,采用 *yemGFP* 作为报告基因,构建了一个在群体细胞间产生同步响应的遗传模块。利用一个微流装置来控制细胞的浓度以及流速,结果群体中的细胞以相同的步调表达荧光蛋白,菌群的同步震荡放大了单个细胞所接受的信号强度。另外, Balagadde 等^[74]构建了捕食-被捕食(Predator-prey)的细菌生态系统,捕食者会引起被捕食自杀,同时它需要被捕食的信号来存活。结果如预想的那样捕食者和被捕食者在群体上此涨彼落。对于生物炼制和生物医药等研究,细胞代谢生长的同步具有重要的意义。例如,在发酵过程中,工程菌的同步生长和表达特定的酶系对产物高效的生成至关重要。另外,这种细胞同步化的荧光闪烁还可以检测特定的毒素以及用于传递药物,通过调整振幅和频率控制药物的剂量和投放时间。如果说遗传工程是上一代生物技术的话,那么作为下一代生物技术的合成生物学是生物技术发展的一个新的制高点。

6 结语与展望

由遗传学的理论和遗传工程发展出来的各种组学(基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学等)平台技术,发展出来了“自上而下”的综合分析,“整体”的建立和认识复杂生命体系的研究规律。然而只有当“自下而上”的“合成、构建”完整的、具有“设计”活力的生命体系时,人们对生命体系的系统认识才算是得到了最终的验证。与此同时以“发现生命遗传规律”为特征的遗传学,也将上升到以“创新生命”为特征的合成生物学。

尽管合成生物学近年来得到了迅猛发展, 已经可以提供能重复使用的遗传成分的工具箱, 并随意插入到遗传网络中去, 但是当涉及到生命如何运作这一命题时, 问题就变得相当复杂。从找到遗传组件到设计和构建整个遗传网络系统, 还存在很多问题: 许多遗传组件的功能尚不清楚, 组件组成的遗传网络难以预测, 网络复杂难于处理, 众多组件不兼容, 以及系统不稳定^[75]。但是可以预见的是与遗传学肩负着同样使命的合成生物学, 将会使这个新兴的学科的研究上升至系统以及更高的水平, 随之所产生的新技术、新方法将带来更加广阔的应用前景。

参考文献(References):

- [1] 闫桂琴, 郜刚. 遗传学. 北京: 科学出版社, 2010. [DOI](#)
- [2] Drubin DA, Way JC, Silver PA. Designing biological systems. *Gene Dev*, 2007, 21(3): 242–254. [DOI](#)
- [3] 赵国屏. 合成生物学: 从科学内涵到工程实践——访中国科学院院士赵国屏. *生物产业技术*, 2010, (5): 87–89. [DOI](#)
- [4] Gibbs WW. Synthetic life. *Sci Am*, 2004, 290(5): 74–81. [DOI](#)
- [5] Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, Pieper R, Parmar PP, Hutchison CA, Smith HO, Venter JC. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science*, 2007, 317(5838): 632–638. [DOI](#)
- [6] Ball P. Designs for life. *Nature*, 2007, 448(7149): 32–33. [DOI](#)
- [7] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM, Merryman C, Vashee S, Krishnakumar R, Assad-Garcia N, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Young L, Qi ZQ, Segall-Shapiro TH, Calvey CH, Parmar PP, Hutchison CA III, Smith HO, Venter JC. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52–56. [DOI](#)
- [8] Wimmer E, Mueller S, Tumpey TM, Taubenberger JK. Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(12): 1163–1172. [DOI](#)
- [9] May M. Engineering a new business. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(12): 1112–1120. [DOI](#)
- [10] Mueller S, Coleman JR, Wimmer E. Putting synthesis into biology: A viral view of genetic engineering through *De Novo* gene and genome synthesis. *Chem Biol*, 2009, 16(3): 337–347. [DOI](#)
- [11] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, Stockwell TB, Brownley A, Thomas DW, Algire MA, Merryman C, Young L, Noskov VN, Glass JI, Venter JC, Hutchison CA III, Smith HO. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, 319(5867): 1215–1220. [DOI](#)
- [12] Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, Montague MG, Venter JC, Smith HO, Hutchison CA III. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51): 20404–20409. [DOI](#)
- [13] Shao ZY, Zhao H, Zhao HM. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(2): e16. [DOI](#)
- [14] Tian JD, Gong H, Sheng NJ, Zhou XC, Gulari E, Gao XL, Church G. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature*, 2004, 432(7020): 1050–1054. [DOI](#)
- [15] Matzas M, Stähler PF, Kefer N, Siebelt N, Boisguerin V, Leonard JT, Keller A, Stähler CF, Häberle P, Gharizadeh B, Babrzadeh F, Church GM. High-fidelity gene synthesis by retrieval of sequence-verified DNA identified using high-throughput pyrosequencing. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(12): 1291–1294. [DOI](#)
- [16] Kosuri S, Eroshenko N, LeProust EM, Super M, Way J, Li JB, Church GM. Scalable gene synthesis by selective amplification of DNA pools from high-fidelity microchips. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(12): 1295–1299. [DOI](#)
- [17] Benner SA. Unite efforts and conquer mysteries of artificial genetics. *Science*, 2000, 290(5496): 1506. [DOI](#)
- [18] Wang LR, Chen S, Xu TG, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou XF, You DL, Deng ZX, Dedon PC. Phosphorothioation of DNA in bacteria by dnd genes. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(11): 709–710. [DOI](#)
- [19] Shaw BR, Dobrikov M, Wang X, Wan J, He KZ, Lin JL, Li P, Rait V, Sergueeva ZA, Sergueev D. Reading, writing, and modulating genetic information with boranophosphate mimics of nucleotides, DNA, and RNA. *Ann N Y Acad Sci*,

- 2003, 1002: 12–29. [DOI](#)
- [20] Renders M, Lievrouw R, Krecmerová M, Holý A, Herdewijn P. Enzymatic polymerization of phosphonate nucleosides. *Chem Biol Chem*, 2008, 9(17): 2883–2888. [DOI](#)
- [21] Benner SA. Understanding nucleic acids using synthetic chemistry. *Acc Chem Res*, 2004, 37(10): 784–797. [DOI](#)
- [22] Yang ZY, Hutter D, Sheng PP, Sismour AM, Benner SA. Artificially expanded genetic information system: a new base pair with an alternative hydrogen bonding pattern. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(21): 6095–6101. [DOI](#)
- [23] Channon K, Bromley EHC, Woolfson DN. Synthetic biology through biomolecular design and engineering. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18(4): 491–498. [DOI](#)
- [24] Pósfai G, Plunkett G III, Fehér T, Frisch D, Keil GM, Umenhoffer K, Kolisnychenko V, Stahl B, Sharma SS, de Arruda M, Burland V, Harcum SW, Blattner FR. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312(5776): 1044–1046. [DOI](#)
- [25] Itaya M, Tsuge K, Koizumi M, Fujita K. Combining two genomes in one cell: stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(44): 15971–15976. [DOI](#)
- [26] Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Mol Syst Biol*, 2005, 1(1): 2005.0018. [DOI](#)
- [27] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, Powell K, Stemmer WPC, del Cardayre SB. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, 415(6872): 644–646. [DOI](#)
- [28] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu GG, Forest CR, Church GM. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460(7257): 894–898. [DOI](#)
- [29] Glass JI, Assad-Garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, Maruf M, Hutchison CA III, Smith HO, Venter JC. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(2): 425–430. [DOI](#)
- [30] Kang Z, Geng YP, Xia YZ, Kang JH, Qi QS. Engineering *Escherichia coli* for an efficient aerobic fermentation platform. *J Biotechnol*, 2009, 144(1): 58–63. [DOI](#)
- [31] Liu Q, Luo G, Zhou XR, Chen GQ. Biosynthesis of poly (3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metab Eng*, 2011, 13(1): 11–17. [DOI](#)
- [32] Lee SJ, Song H, Lee SY. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3): 1939–1948. [DOI](#)
- [33] Gao H, Zhuo Y, Ashforth E, Zhang LX. Engineering of a genome-reduced host: practical application of synthetic biology in the overproduction of desired secondary metabolites. *Protein Cell*, 2010, 1(7): 621–626. [DOI](#)
- [34] Mizoguchi H, Mori H, Fujio T. *Escherichia coli* minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46(Pt 3): 157–167. [DOI](#)
- [35] Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, Tanaka K, Fujimitsu K, Keyamura K, Ote T, Yamakawa T, Yamazaki Y, Mori H, Katayama T, Kato J. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol*, 2005, 55(1): 137–149. [DOI](#)
- [36] Morimoto T, Kadoya R, Endo K, Tohata M, Sawada K, Liu SG, Ozawa T, Kodama T, Kakeshita H, Kageyama Y, Manabe K, Kanaya S, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res*, 2008, 15(2): 73–81. [DOI](#)
- [37] Murakami K, Tao E, Ito Y, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Sumiya T, Nakamura A, Nishizawa M. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(3): 589–597. [DOI](#)
- [38] Komatsu M, Uchiyama T, Ōmura S, Cane DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(6): 2646–2651. [DOI](#)
- [39] Calvert J. Synthetic biology: constructing nature? *Sociol Rev*, 2010, 58(S1): 95–112. [DOI](#)
- [40] Nevoigt E, Fischer C, Mucha O, Matthäus F, Stahl U, Stephanopoulos G. Engineering promoter regulation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(3): 550–558. [DOI](#)
- [41] Jensen PR, Hammer K. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 58(2-3): 191–195. [DOI](#)

- [42] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, Stephanopoulos G. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12678–12683. [DOI](#)
- [43] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9(3): 258–267. [DOI](#)
- [44] Jensen PR, Hammer K. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(1): 82–87. [DOI](#)
- [45] Davis JH, Rubin AJ, Sauer RT. Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(3): 1131–1141. [DOI](#)
- [46] Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, 2003, 113(5): 577–586. [DOI](#)
- [47] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346(6287): 818–822. [DOI](#)
- [48] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX-a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*, 2007, 24(4): 381–403. [DOI](#)
- [49] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249(4968): 505–510. [DOI](#)
- [50] Bauer G, Suess B. Engineered riboswitches as novel tools in molecular biology. *J Biotechnol*, 2006, 124(1): 4–11. [DOI](#)
- [51] Werstuck G, Green MR. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science*, 1998, 282(5387): 296–298. [DOI](#)
- [52] Bayer TS, Smolke CD. Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(3): 337–343. [DOI](#)
- [53] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, Keasling JD. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1027–1032. [DOI](#)
- [54] Farmer WR, Liao JC. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(5): 533–537. [DOI](#)
- [55] Bhalerao KD. Synthetic gene networks: the next wave in biotechnology? *Trends Biotechnol*, 2009, 27(6): 368–374. [DOI](#)
- [56] Purnick PEM, Weiss R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(6): 410–422. [DOI](#)
- [57] Leloup JC, Goldbeter A. A model for circadian rhythms in *Drosophila* incorporating the formation of a complex between the PER and TIM proteins. *J Biol Rhythms*, 1998, 13(1): 70–87. [DOI](#)
- [58] Hasty J, McMillen D, Collins JJ. Engineered gene circuits. *Nature*, 2002, 420(6912): 224–230. [DOI](#)
- [59] Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403(6767): 339–342. [DOI](#)
- [60] Elowitz MB, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, 403(6767): 335–338. [DOI](#)
- [61] Fung E, Wong WW, Suen JK, Bulter T, Lee SG, Liao JC. A synthetic gene-metabolic oscillator. *Nature*, 2005, 435(7038): 118–122. [DOI](#)
- [62] Stricker J, Cookson S, Bennett MR, Mather WH, Tsimring LS, Hasty J. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature*, 2008, 456(7221): 516–519. [DOI](#)
- [63] Levskaya A, Chevalier AA, Tabor JJ, Simpson ZB, Lavery LA, Levy M, Davidson EA, Scouras A, Ellington AD, Marcotte EM, Voigt CA. Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature*, 2005, 438(7067): 441–442. [DOI](#)
- [64] Lu TK, Khalil AS, Collins JJ. Next-generation synthetic gene networks. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(12): 1139–1150. [DOI](#)
- [65] Çağatay T, Turcotte M, Elowitz MB, Garcia-Ojalvo J, Süel GM. Architecture-dependent noise discriminates functionally analogous differentiation circuits. *Cell*, 2009, 139(3): 512–522. [DOI](#)
- [66] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(1): 64–76. [DOI](#)
- [67] 王俊姝, 祁庆生. 合成生物学与代谢工程. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1296–1302. [DOI](#)
- [68] 张柳燕, 王晶. 合成生物学研究进展与应用. *生物产业技术*, 2010, (5): 54–60. [DOI](#)
- [69] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling

- JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796–802. [DOI](#)
- [70] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940–943. [DOI](#)
- [71] Kang Z, Gao CJ, Wang Q, Liu HM, Qi QS. A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(19): 7675–7678. [DOI](#)
- [72] Streips UN, Yasbin RE. Modern microbial genetics. New York: Wiley-Liss Inc, 2002.
- [73] Danino T, Mondragón-Palomino O, Tsimring L, Hasty J. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 2010, 463(7279): 326–330. [DOI](#)
- [74] Balagaddé FK, Song H, Ozaki J, Collins CH, Barnet M, Arnold FH, Quake SR, You L. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 187. [DOI](#)
- [75] Kwok R. Five hard truths for synthetic biology. *Nature*, 2010, 463(7279): 288–290 [DOI](#)

•综合信息•

大米食品安全的关键控制技术

张东杰, 翟爱华, 王颖 著

978-7-03-032063-6 定价: 68 元 装帧: 平装 开本: B5 分类: 生物科学

内容简介

本书以大米食品安全危害、食品安全关键技术的基本知识及食品安全关键技术在大米生产全程中的应用为主线, 重点介绍了大米食品安全危害来源, 食品安全控制技术原理及大米安全控制关键技术的现状, 大米加工工艺改进及质量安全关键点控制技术, 大米包装储运品质变化、质变规律及风险评估与预警等质量安全控制技术, 大米储藏、包装技术的应用方法以及大米产品追溯系统与召回系统软件的开发等内容。

《大米食品安全的关键控制技术》是以“十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术应用综合示范”项目、“十一五”国家科技支撑计划“食品安全关键技术”重点项目课题“粮油食品安全的综合示范”的研究成果为基础, 结合国际国际食品安全关键技术先进理念, 对食品安全关键技术及关键技术在大米生产全程的应用作了较全面而深入的阐述, 理论与应用技术相结合是本书的主要特色。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇

电话: 010-64017301 E-mail:zhouwenyu@mail.sciencep.com