

从首个合成细胞看合成生物学的现状与发展

张柳燕, 常素华, 王晶*

中国科学院心理健康重点实验室, 中国科学院心理研究所, 北京 100101

* 联系人, E-mail: wangjing@psych.ac.cn

2010-07-29 收稿, 2010-10-19 接受

欧盟第六框架计划(PROBACTYS)(29104)和国家自然科学基金(30700441)资助项目

摘要 合成生物学是一门新兴交叉学科, 诞生至今已在医药、能源、环境、农业等多个领域展现出巨大的应用前景和发展潜力, 对探索生命起源与进化等生物学基本问题亦发挥重要作用. 随着 2010 年 5 月首个合成细胞的诞生, 合成生物学再次引起了社会各界的高度关注和广泛讨论. 欧美等国已在合成生物学领域开展多项研究并已取得诸多成果. 为了推动和促进这一新兴学科在中国的发展, 本文在阐明合成生物学概念及研究内容的基础上, 一方面综述了合成生物学的研究现状及国内外发展, 分析了合成生物学所面临的机遇与挑战; 另一方面, 对合成生物学未来的发展, 尤其是在中国的发展作出展望.

关键词

合成生物学
合成细胞
最小基因组

2010 年 5 月 21 日, 美国科学家 J. Craig Venter 领导的合成基因组学研究小组在 *Science* 发表了他们的最新成果——合成细胞^[1]. 该细胞由一个完全化学合成的基因组所控制, 并能在实验室条件下正常生长. 这项研究是合成生物学发展历程中的一次突破性进展, 引起了科学界乃至社会各界广泛的关注和讨论. 合成生物学作为一门新兴的交叉学科, 再次成为科学界的焦点之一. 英国皇家工程院 2009 年的一份报告指出, “合成生物学有望创造出新的重大产业, 其发展很有可能对英国、欧洲以及世界经济的未来产生深远影响”^[2]. 合成生物学作为一门正处于快速发展阶段的、并有望成为 21 世纪引领生命科学领域乃至整个科学领域的重要学科, 以其独特的研究理念、富有挑战性的研究目标和巨大的科学价值与社会应用价值, 正在世界范围内激起新一轮的科技热潮. 针对合成生物学在欧美蓬勃发展的现状, 以及合成生物学巨大的应用前景和发展潜力, 我们有必要对这一学科进行全面而深入的了解, 以推动和促进我国在这一新兴前沿领域的发展. 本文从合成生物学的概念、特点、发展历程、国内外现状以及面临的机遇和挑战等方面, 对合成生物学进行详细介绍, 同

时对合成生物学未来的发展趋势, 尤其对我国开展合成生物学研究的方向和前景进行探讨与展望.

1 合成生物学概览

1.1 合成生物学概念

合成生物学旨在利用测序技术、计算机建模及模拟技术、生物工程技术、化学合成技术等, 在工程学思想的指导下, 从头设计并构建新的生物组件、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生物系统或生物模块来处理信息、操作化合物、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^[2-5]. 合成生物学的特点在于工程学思想与生物学研究的充分融合. 合成生物学遵循工程设计的原理: 将标准化-设计-建模/模拟-实施-测试的工程学思想核心引入到生物系统的设计与构建中(图 1). 合成生物学的基本出发点之一是将复杂的生命系统拆分为各个功能元件, 通过对生物元件(parts)进行标准化、模块化定义, 以实现生物元件的逐级组装(devices), 直至构建一个新的功能系统(systems). 基于标准化

英文版见: Zhang L Y, Chang S H, Wang J. Synthetic biology: From the first synthetic cell to see its current situation and future development. *Chinese Sci Bull*, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-010-4304-z

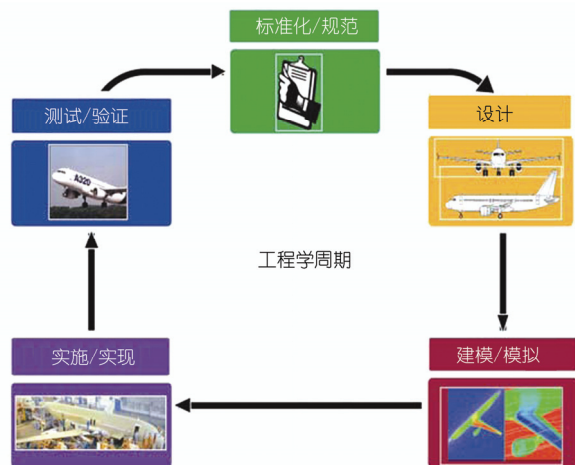


图1 合成生物学的研究思路采用工程学中类似于飞机制造的周期和循环(参考文献[6])

首先, 对所用到的部件进行标准化和规范化的说明; 然后, 针对目标进行设计, 并通过计算机的建模和模拟得到理论可行的模型, 再依据模型在工厂里进行实施和制造; 最后, 对成品进行测试和验证。为使飞机的各项指标满足需求, 在测试和验证后, 还需要针对模型中的问题重新开始此循环, 直至获得令人满意的成果

的生物元件所设计和构建出的生物模块, 其输出的可控性和预测性均在一定程度上得到了提高。图2对合成生物学的这一特性以及与传统遗传工程的区别进行了形象地展示^[5]。

任何一门新兴学科, 其产生和发展都不是孤立的, 都是建立在现有学科和技术发展基础之上的。但学科之所以称之为“新”, 主要在于其研究理念、思考问题的角度和对现有技术的应用侧重点的不同。同时, 随着“新”学科的日趋发展和科学家们对学科认识的不断深入, 学科本身势必又将引领一批新技术和新方法的产生, 这是一个正向循环、互相促进的过程。合成生物学也不例外。基因组学、遗传学、分子生物学、细胞生物学、系统生物学等相关研究加深了人类对生命系统的认识, 为合成生物学提供雄厚的知识储备(“认识生命”); 生物信息学、计算机及数学为合成生物学的设计、建模与模拟提供了强有力的理论及技术支持(“设计生命”); 基因工程、代谢工程等技术工具和方法也被应用于合成生物学对生物模块和生物系统的操作过程中(“操作生命”, 或称之为“工程化生命”)。合成生物学不但可以改造生命, 更为重要的是, 可以创造新的生命。因此, 可以将合成生物学视为一种革命性的全新的生物技术, 是生物技术与相关高技术领域发展的一个新的制高点。另一方

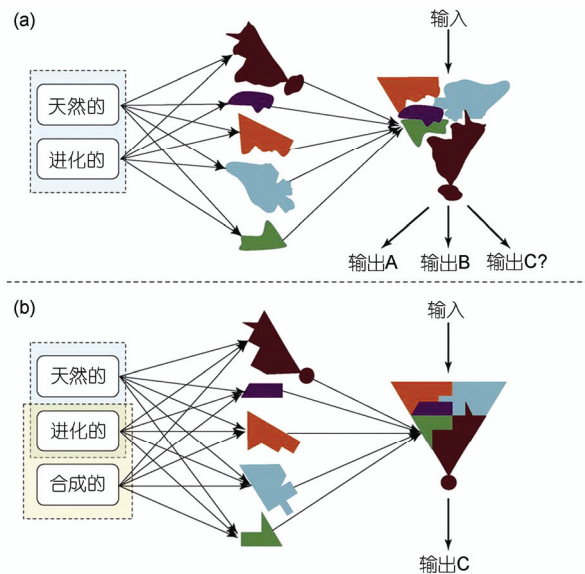


图2 传统遗传工程(a)与合成生物学(b)设计过程的简单示意图(参考文献[5])

传统遗传工程与合成生物学都可以利用天然发生的和经修饰的生物元件来构建精心设计的工程化的系统。然而, 由于传统遗传工程方法所使用的模块及其组装方式没有得到很好的定义或标准化, 当它们组装成一个较大的系统时, 往往会产生意想不到的相互作用, 进而导致次优组合和多效性结果的产生。这意味着输出经常是不可预测的, 且强烈依赖于具体零件和组装方法的选择。相比之下, 合成生物学开始于标准化生物元件的发展, 这些元件具有标准化的接口, 从而能够被固定下来并建立最优化组合。这样的结果自然是一个高度可预测性的工程化系统, 对于单个输入只产生单一的对应的输出

面, 合成生物学作为一种新的研究思路和研究手段, 也被用来研究生命科学中的一些基本问题, 如生命起源、进化、发育等。

1.2 合成生物学主要研究内容

合成生物学的研究目标非常明确: 从头合成新的生命体, 或者对已有生命体进行工程化改造, 从而实现新的功能。为了实现这些目标, 科学家们从不同层次、不同角度进行了探索。目前, 合成生物学的研究主要集中在3个方面: (1) 生物元件标准化及生物模块的设计与构建; (2) 最小基因组研究; (3) 基因组的设计、合成与组装。如果将“重构生命”比作制造汽车, 那么生物模块就像汽车的引擎、活塞、曲轴等“零部件”, 而基因组则是装载这些零件、并使其协同发挥作用的“底盘”。“零部件”为汽车提供各种性能, 稳固的“底盘”为“零部件”有效地发挥其性能以及各“零

部件”之间的相互协调提供强有力的保障,两者对于汽车高效的工作均必不可少。

(i) 生物元件标准化及生物模块的设计与构建. 按照一定标准或规范(包括对前缀、后缀、特殊位点、组装方式等的规定)设计和构建(寡核苷酸订制、PCR或 *de novo* 合成)生物元件(包括启动子、终止子、蛋白编码序列等常见 DNA 组分), 并对该生物元件进行详尽的描述(如序列、特性、获取途径等)及质量控制测试等, 使其具有特征明显、功能明确且能与其他元件进行自由组装等特性, 这些过程称为生物元件的标准化. 当合成生物学的“零件”——生物元件的参数被确定及标准化, 生物模块(devices, systems)的设计与构建就会变得容易而可靠. 细胞中启动子与抑制子之间相互作用的关系表现出与电路系统中开关和振荡器等类似的特性, 基于这类特性, 对标准化的生物元件进行不同层次的设计和组装, 能够产生与工程学电路研究中类似的系统(图 3). 这样的生物系统其输出的可控性和可预测性均在一定程度上得到了提高. 生物模块构建既包括新的生物元件、设备或系统的从头设计与构建, 也包括对现有的自然界中的生物系统进行重新设计和改造. 一些自然物质和非自然物质的设计或人工合成也被认为是合成生物学的内容之一, 如人工核糖体的合成以及由天然不存在的碱基组成的遗传因子的人工合成等。

(ii) 最小基因组研究. 新的生物模块需要在一个合适的载体细胞(也称为“底盘”细胞, chassis)中进

行表达. 理想的载体细胞应该具有精简、健壮基因组结构, 即“最小”基因组, 从而最大程度降低噪声干扰(noise), 降低研究问题的复杂度, 提高对所设计系统的可控性和可操作性. 最小基因组是指在最适宜条件下维持细胞生长繁殖所必需的最小数目的基因^[8]. 因此, 最小基因组研究的核心就是确定基因的必需性. 根据基因必需性的信息, 一方面可以对现有的基因组进行有目的地精简, 删除非必需的基因组片段(“自上而下”策略, top-down); 另一方面也可以对必需基因进行重新设计、合成与组装(“自下而上”策略, bottom-up), 这两种方法是目前公认的实现最小基因组构建的两种策略^[9]. 当然, 这个“最小”的概念是相对的, 并不是绝对的. 此外, 不存在可以适用于各种生物学用途的通用底盘. 随着 DNA 测序技术的发展, 越来越多的微生物基因组被测序, 为我们针对特定问题选择合适的“底盘”细胞, 并对其基因组进行最小化研究提供了重要的基础。

(iii) 基因组的设计、合成与组装. 合成生物学研究, 不管是生物模块构建还是最小基因组研究, 归根结底都是对基因组序列的操作. 要想实现“工程化生命”, 对基因组的操作技术, 尤其是基因组的“读-写”, 即基因组测序技术、DNA 合成技术必不可少. 基因组测序技术使得我们能够“阅读”生命的“天书”, 帮助我们认识复杂的生命系统; 在此基础上, 通过计算机建模与模拟, 实现对生命体 *in silico* 水平的设计与改造; 而 DNA 合成技术则使得我们能够根据 *in*

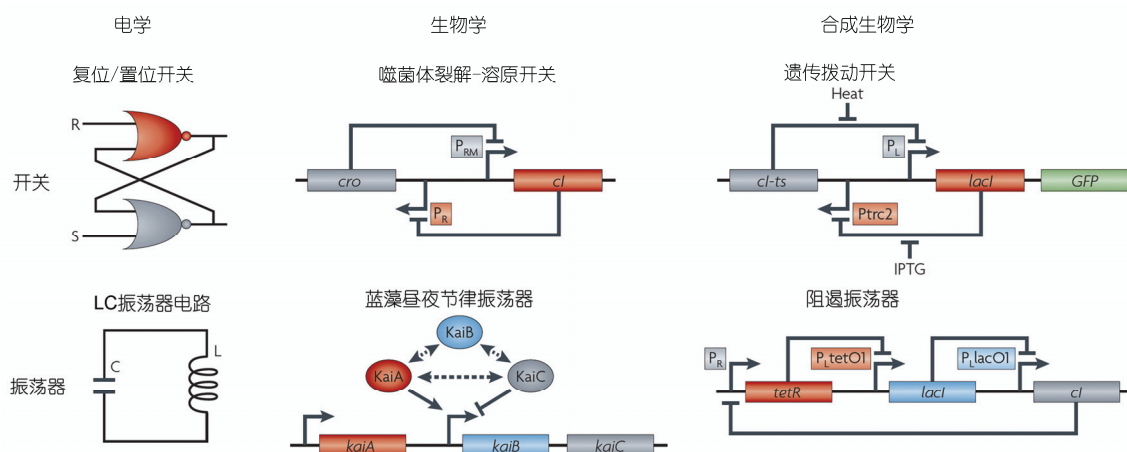


图 3 从工程学的电路到合成生物学的模块(参考文献[7])

发生在电路系统中的开关和振荡器的现象在生物信号转导及生物调控过程中同样可以看到. 其中, 启动子、诱导子和抑制子是重要的作用单元. 利用它们的相互作用特性, 模拟工程电路系统, 便可以设计并构建出与工程电路具有相似或相同特性的合成生物系统

silico 设计重新“书写”生命的天书. 这一技术体系的建立和完善是合成生物学发展的重要前提之一.

综上所述, 围绕合成生物学研究目标, 合成生物学各研究内容之间互为联系: 生物元件标准化及生物模块的设计与构建使得我们在深入认识复杂生命体系的基础上, 实现对生命体有目的的设计与改造; 最小基因组研究为新设计的生物模块的功能实现提供理想的表达载体; 而合成基因组技术则为前面二者的实现提供坚实的技术支撑. 三者互为促进, 从而最终实现具有特定功能的、有实际应用价值的崭新的生命体.

2 合成生物学的研究现状

合成生物学因其富有特色的研究思路和巨大的应用前景吸引了众多生物学家、工程学家、数学家等参与其中. 2000 年以来, 在 Drew Andy, Jay D. Keasling, James J. Collins 等多人的推动下, 合成生物学在生物元件标准化及生物模块的设计和构建方面取得了很大进展, 标准化生物元器件库被建立, 控制转录、翻译、蛋白调控、信号识别等各个生命活动的遗传电路也相继被开发, 并有望在实际应用中发挥重要作用. 另一方面, J. Craig Venter 研究所(J. Craig Venter Institute, JCVI)于 1995 年开始的最小基因组及合成基因组学研究也于近期取得了突破性进展. 而基因组精简研究也在近 10 年的发展中开发出多种技术方法用于大片段基因组的删除, 并取得了一定进展.

2.1 生物元件标准化与生物模块设计

设计具有预测功能的生物模块是当前合成生物学最为关注的领域之一. 2000 年, Gardner 等人^[10]在大肠杆菌中成功设计并构建了一个合成的双稳态基因调控网络, 称为基因“拨动开关”(Toggle switch). 同年, Elowitz 和 Leibler^[11]也构建出第一个合成的阻遏震荡器(Repressilator). 这两件事件的完成标志着合成生物学的正式诞生^[12]. 2003 年, 合成生物学委员会(Synthetic Biology Community)及标准生物元件注册处(The Registry of Standard Biological Parts)在麻省理工学院成立. 次年, 第一届国际遗传工程机械大赛(International Genetically Engineered Machine Competition, iGEM)在麻省理工学院举行, BioBricks 基金会(The BioBricks Foundation, BBF)成立, 第一届合成生物学国际会议召开, 这些事件进一步推动和促进了这一领域的发展. iGEM 是一年一度的合成生物学领域最高级别的国际性大学生竞赛. 通过竞赛, 一方面增强全世界大学生对合成生物学的认识、参与和实践, 培养合成生物学跨学科人才; 另一方面, 通过大学生的广泛参与, 不断丰富和完善合成生物学的标准生物元件库. 截至 2010 年, 已有来自多个国家的超过 120 支队伍注册参加该项比赛. 中国自 2007 年起已有多所高校组织在校内参与 iGEM 竞赛并取得了骄人的成绩. 生物元件标准化与生物模块设计的主要进展和事件如表 1 所示.

其中尤为值得一提的是, 美国 Jay D. Keasling 教

表 1 生物元件标准化与生物模块设计大事记

时间	事件
2000 年	Gardner 等人 ^[10] 在大肠杆菌中构建了基因拨动开关(Toggle switch), 一个合成的双稳态基因调控网络
	Elowitz 和 Leibler ^[11] 构建了第一个合成的阻遏震荡器(Repressilator)
2002 年	实现遗传电路的定向进化 ^[13] 以及单个细胞内的随机基因表达 ^[14]
2003 年	麻省理工学院、剑桥等美国学生根据 Elowitz 阻遏震荡器设计了生物振荡器
	Keasling 等人 ^[15] 在美国劳伦斯伯克利国家实验室设立合成生物学部, 并在大肠杆菌中成功地构建了合成青蒿素的网络
	合成生物学委员会(Synthetic Biology Community)及标准生物元件注册处成立
2004 年	第一届国际遗传工程机械大赛(iGEM)在麻省理工学院举行
	第一届合成生物学国际会议在美国麻省理工学院召开
	实现可编程的细菌群体控制 ^[16] 和哺乳动物拨动开关 ^[17]
2005 年	实现了可编程的模式生成 ^[18] 以及酵母中人工胞间通讯的建立 ^[19]
2006 年	Keasling 实验室对多个青蒿素生物合成基因进行优化设计 ^[20] , 并将设计的网络导入酵母菌中产生了青蒿酸, 通过对代谢网络的不断改造和优化, 使产量实现了数量级水平的提高
2007 年	实现 RNAi 和阻遏蛋白开关 ^[21] , 基于 RNAi 的逻辑电路 ^[22] 和核酶开关 ^[23]
	进入 iGEM 决赛的 7 支队伍中有 2 支来自中国(北京大学和中国科学技术大学), 北京大学荣获大奖 ^[24] , 中国科技大学荣获“最佳基础技术奖”
2008 年	利用化学互补法产生转录因子逻辑门 ^[25]

授及其团队有关抗疟疾药物青蒿素微生物工业化合成的研究工作^[15,20]。他们利用合成生物学的方法,对抗疟疾药青蒿素前体青蒿酸的合成通路进行重新设计,将来自细菌、酵母和植物的多种基因及代谢途径进行组装和精密调控,最终获得了可高效生产青蒿酸的工程微生物。这项技术一旦获得推广,将大大降低抗疟疾药的成本,为人类战胜这种疾病提供契机。这项研究的成功显示了合成生物学在医药等领域的巨大应用价值和发展潜力,是合成生物学迈向实际应用的里程碑事件。

各种新生物能源的合成生物学研究也正在火热进行中,以望解决全球面对的能源与环境问题。2007年,美国佛吉尼亚理工大学生物系统工程系 Zhang 等人^[26]利用合成生物学原理,用 13 个已知的酶形成一条非天然的酶催化途径,可以使具有高能量密度载体的淀粉及水在温和的反应条件下高效低本地生产氢气。随着技术的发展及与燃料电池的集成,该项技术有望解决与氢气的储存、销售有关的难题,因而在汽车中的应用具有巨大潜力。采用合成生物学的研究思路与方法,2010 年,Keasling 和其团队^[27]构建出可以将半纤维素或葡萄糖转化为脂肪酸衍生燃料等化学物质的生物模块,使得经改造的大肠杆菌具有生产生物燃料及其他生物材料的潜力。世界多个石油公司已经开始加大对合成生物学的投入,合成生物学必将对能源领域产生巨大影响。

2.2 最小基因组研究

最小基因组研究始于 1995 年生殖道支原体 (*Mycoplasma genitalium*) 全基因组测序的完成^[28]。这种支原体拥有自然界自由生长的微生物中最小的基因组,长度只有 580 kb,编码约 480 个基因。这激发了众多研究者去进一步探索可以维持一个细胞正常生存的最小基因组。同时,科学家们也期望从最小基因组和最小细胞的研究中探索生命进化和起源的奥秘。

最小基因组研究的核心是确定基因对于维持细胞正常生命活动的必需性。用于研究必需基因的方法主要有比较基因组学^[29,30]、大规模基因失活实验^[31-36]以及基于代谢网络的预测方法^[37]。目前已经对多个物种的必需基因进行了实验或理论研究,在相关综述文章中已有详细的介绍^[38,39]。经过实验鉴定,即使在生殖道支原体的基因组中也存在着约 100 个非必需基因^[32],这些基因失活后不会对细胞的正

常生命活动产生影响;模式微生物大肠杆菌及枯草芽孢杆菌基因组中的必需基因比例不足 10%^[34,40]。值得一提的是,必需基因的定义与物种、环境等密切相关,很难定义一个广谱的必需基因集。必需基因的研究结果将为最小基因组自上而下研究策略的基因组精简,或自下而上策略的从头合成提供指导。

在基因组精简研究方面,目前的研究方法主要有基于自杀质粒的同源重组方法、基于线性 DNA 的同源重组方法、基于位点特异性重组酶的方法和基于转座子的方法。这 4 种方法在文献中都有详细介绍^[38,41]。已经完成的基因组精简研究如表 2 所示。

2.3 基因组的设计、合成与组装

(i) 病毒基因组的合成。20 世纪 70 年代,DNA 合成技术、重组 DNA 技术的建立为后来的遗传工程及生物学研究开辟了新的道路。1970 年,Agarwal 等人^[54]首次用化学方法人工合成含有 77 个核苷酸对的酵母丙氨酸结构基因。此后,DNA 合成技术获得了快速的发展,多种具有活性的病毒基因组被合成出来(表 3)。

(ii) 细菌的合成基因组学。JCVI 研究所的研究团队历时 15 年构建了第一个自我复制的合成细菌细胞,并于 2010 年 5 月 21 日在 *Science* 上发表了他们的这一成果^[1]。创造出这样一个由合成基因组完全控制的细胞,研究人员先后攻克了 3 大技术难关:(1) 以化学合成的方式从头合成,并自组装成一个完整的基因组;(2) 细胞间全基因组移植(包括原核细胞间以及原核细胞与真核细胞之间),使受体细胞完全由植入的天然基因组所控制;(3) 将化学合成的基因组移植入受体细胞中,并由植入的合成基因组控制细胞的生命活动。在构建这样一个合成细胞的过程中,还面临诸多挑战,如单核苷酸多态性的检测与设计、DNA 合成的质量控制、移植过程中 DNA 甲基化的修饰等。据估计,完成这项研究共耗资约 4000 万美元,以及 20 个人超过 10 年的工作量。这项研究中的重要事件如表 4 所示。

支原体细菌较小的基因组使得它们成为合成基因组学研究的最佳对象。2008~2009 年在实现了生殖道支原体的全基因组化学合成及细胞间基因组移植之后,JCVI 团队选择了另一种支原体——蕈状支原体 (*Mycoplasma mycoides*) 作为基因组供体,山羊支原体 (*Mycoplasma capricolum*) 作为细胞环境受体,利用已

表 2 基因组精简研究进展概览(参考文献[41])

菌株	删除片段总长	删除的功能(D)和新的特性(C)
大肠杆菌		
Δ20A-4	218.7 kb (5.6%) ^[42]	(D) 随机区域
CD Δ3456	313.1 kb (6.7%) ^[43]	(D) 非特异性目标区域
		(C) 表现出互斥区域
MDS12	376.1 kb (8.1%) ^[44]	(D) 菌株特异性区域(K-islands)
		(C) 与亲代细胞无明显变化
MDS43	708.3 kb (15.3%) ^[45]	(D) K-islands, 移动因子
		(C) 细胞稳定性及电转化效率增强
MGF-01	1.03 Mb (22%) ^[46]	(D) 不影响生长效率的非必需区域
		(C) 苏氨酸产量增加到 2 倍
Δ16	1.38 Mb (29.7%) ^[47]	(D) 文献中报道的非必需基因
		(C) 生长速率降低, 拟核位置异常
枯草芽孢杆菌		
Δ6	320 kb (7.7%) ^[48]	(D) 噬菌体, 多聚乙酰合成基因
MG1M	991 kb (24%) ^[49]	(D) 噬菌体, 多聚乙酰合成、次级代谢基因
		(C) 生长速率降低
MGB874	873.5 kb (20.7%) ^[50]	(C) 胞外纤维素酶产量增加到 1.7 倍, 蛋白酶产量增加到 2.5 倍
谷氨酸棒状杆菌	190 kb (5.7%) ^[51]	(D) 菌株特异性区域(R-islands)
粟酒裂殖酵母	~500 kb (4%) ^[52]	(C) 生长速率降低
酿酒酵母	531.5 kb (5%) ^[53]	(C) 乙醇产量增加到 1.8 倍, 甘油产量增加到 2 倍

表 3 病毒基因组合成大事记

时间	事件	基因组大小/kb
2002 年 8 月	Cello 等人 ^[55] 制造了第一个人工合成的病毒——脊髓灰质炎病毒	7.5
2003 年 12 月	Smith 等人 ^[56] 合成了噬菌体φX174 的基因组	5.4
2004 年 10 月	美国、加拿大与日本的学者合作人工合成了 1918 年西班牙流感病毒基因, 合成的病毒表 现出与 1918 流感病毒相近的致病性 ^[57]	1.7(HA)+1.4(NA)
2008 年 12 月	Becker 等人 ^[58] 设计并合成了蝙蝠 SARS 样冠状病毒	29.7

表 4 JCVI 合成基因组学研究的里程碑事件

发表时间	事件
1995 年 10 月	生殖道支原体全基因组测序完成, 共 580 kb, 编码约 480 个基因 ^[28]
1999 年 12 月	采用转座子随机突变的方法初步确定生殖道支原体的必需基因约有 265~350 个 ^[59]
2003 年 12 月	仅在 14 d 的时间内完成了噬菌体φX174 全基因组的组装 ^[56]
2006 年 1 月	采用单基因突变方法对生殖道支原体的必需基因进行精确筛选, 在 482 个编码基因中确定了 382 个基因是必需的 ^[32]
2007 年 8 月	实现细菌之间的基因组移植, 将蕈状支原体基因组植入山羊支原体的裸细胞中, 并产生出新的蕈状支原体 ^[60]
2008 年 1 月	化学合成、组装并克隆生殖道支原体的全基因组, 这是第一个人工合成的原核生物基因组 ^[61]
2008 年 12 月	在酵母中, 实现从 25 个 DNA 片段一步组装成生殖道支原体基因组的组装技术 ^[62]
2009 年 9 月	实现基因组在两个生命分支间的转移, 从一个原核细胞到真核细胞再回到原核细胞 ^[63]
2010 年 5 月	创造出一个由化学合成基因组控制的细菌细胞 ^[1]

建立的技术体系于 2010 年完成了合成细胞的设计与构建. 之所以没有选择基因组更小的生殖道支原体是因为这种细菌在实验室培养条件下生长缓慢, 而蕈状支原体及山羊支原体具有相对较快的生长速率. 构建该合成细胞的主要步骤如下: (1) 以天然的蕈状支原体基因组为模板, 设计出 1078 个长度均为 1080 bp 的 DNA 片段, 每个 DNA 片段末端都带有 80 bp

的重复序列. 由 DNA 合成公司根据 JCVI 的设计化学合成 1078 个 DNA 盒; (2) 利用酵母将 1078 个 DNA 盒分三步组装成为完整的基因组: 第一步每次使用 10 个 DNA 盒构建出 109 个长度为 10 kb 的 DNA 片段; 第二步每次使用 10 个 10 kb 的片段构建出 11 个长度为 100 kb 的片段; 最后, 通过使用酵母基因系统, 将这 11 个 100 kb 的片段组装成一个完整的合成

基因组; (3) 从酵母细胞中释放合成的基因组, 并将其移植入山羊支原体受体细胞中. 经孵化筛选, 仅含有合成基因组的细胞存活下来. 这些细胞完全由合成的基因组所控制, 并表现出草状支原体的特征.

JCVI 研究所“合成细胞”的研究无疑是合成生物学发展历程中重要的一笔. 这项工作不仅为合成生物学提供了相应的技术体系(如基因组设计、合成、组装、移植技术等), 同时对于揭示生命现象和本质具有重要的科学价值.

3 合成生物学的国内外发展

3.1 合成生物学在欧美

合成生物学在医药、能源、环境、农业等方面所展现的巨大应用前景已引起欧美国家的的高度重视. 2004 年美国的《技术评论》杂志将合成生物学列为将改变世界的新出现的十大技术之一. 美国生物经济研究会 2007 年发表了《基因组合成和设计之未来, 对美国的影响》的研究报告. 美国《时代》周刊将“创造生命”列为 2008 年 10 大科学发现. 英国皇家工程院于 2009 年 5 月发表了《合成生物学》蓝皮书, 不但系统阐明了合成生物学研究范围、应用前景及其社会影响, 而且明确提出英国要在不久的未来保持和提高其在该领域的绝对国际领先地位(第一、第二的位置). 为此, 美国、德国、英国等发达国家纷纷投入巨资, 有组织、有计划地开展合成生物学研究, 以抢占合成生物学研究和发展的先机.

人类基因组计划完成后, 美国能源部启动了 GTL(Genome To Life)计划, 其中提到了“合成基因组研究项目”, 包括“从可编程的 DNA 微芯片进行精确的、低成本的基因合成”、“构建一个合成的基因组”等. 美国国家自然科学基金 2006 年投入 2000 万美元资助建立了“合成生物学工程研究中心”(Synthetic Biology Engineering Research Center, SynBERC), 由哈佛大学、麻省理工学院、加州大学旧金山分校(UCSF)、伯克利分校(UCB)等共同组建. 欧洲方面, 2005 年欧盟委员会在第六框架计划中发表了“合成生物学——将工程应用于生物学”的项目报告. 该报告展望了合成生物学未来 10~15 年在生物医药、小分子药物的体内合成、生命化学的拓展、可持续的化学工业、环境与能源、智能材料及生物材料等方面的前景, 分析了合成生物学的回报及存在的风险, 提出了欧盟在研究、支撑基础和教育等方面应该采取的行动.

2007 年欧盟委员会启动了“合成生物学——新出现的科学技术”引导项目共 18 项. 英国生物技术与生物科学理事会(BBSRC)在 2008 年就将合成生物学列为优先资助的研究领域. 威尔逊国际学者中心(The Woodrow Wilson International Center for Scholars)2010 年 6 月 4 日发布的调查报告中显示, 据初步的数据统计, 自 2005 年至 2010 年 6 月, 美国已花费约 43 亿美元资助合成生物学相关研究; 欧盟委员会及 3 个欧洲国家(德国、英国、荷兰)也已花费约 16 亿美元用于资助合成生物学研究. 欧美国家对合成生物学研究的关注和资助力度呈逐年上升的趋势(图 4).

3.2 合成生物学在中国

合成生物学的兴起, 在中国的科学技术界迅速引起反响. 中国科学院在制定 50 年科学发展路线图时将“人造生命”列入其中. 2008 年 2 月, 在天津大学张春霆、中国科学院微生物研究所魏江春二位院士和清华大学孙之荣教授主持下召开了合成生物学香山会议, 这是中国国内第一次合成生物学学术会议, 会议产生了积极的影响; 中国科学院合成生物学重点实验室于 2009 年 7 月召开了“基于合成生物学的重大药物和能源产品的设计”的战略研讨会; 中国科学院北京生命科学研究院于 2009 年 8 月和 11 月, 两次举办合成生物学研讨会, 邀请一批院士、专家和学者共同探讨合成生物学研究现状与发展战略, 推动合成生物学在我国的发展; 2009 年 12 月, 上海交通大学与中国科学院上海生命科学研究院合作承办了东方

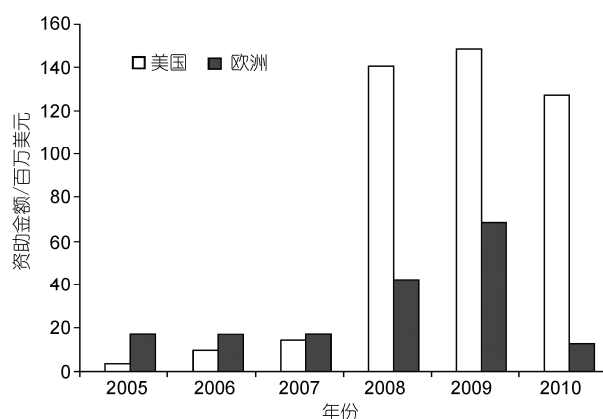


图 4 2005~2010 年 6 月, 美国和欧洲对合成生物学相关研究的年资助金额情况

欧洲仅包含欧盟及德国、英国、荷兰 3 个国家. 数据来自 <http://www.synbioproject.org/library/publications/archive/researchfunding/>

科技论坛 2009 年特刊“合成生物学基础前沿问题”高峰论坛; 2010 年 7 月, 在中国科学技术协会的支持下, 中国科学院北京生命科学研究院在苏州组织召开了“合成生物学的伦理问题与生物安全”学术研讨会. 我国部分科研单位也成立了合成生物学相关研究机构. 例如, 天津大学与爱丁堡大学合作, 成立了系统生物学与合成生物学研究中心; 中国科学院成立了中国科学院合成生物学重点实验室; 军事医学科学院成立了合成生物学与生物信息学研究室.

我国科学家也已开展了合成生物学相关研究. 例如, 天津大学生物信息学中心建立了必需基因数据库 DEG (Database of Essential Genes), 系统收集整理了已发表的实验必需基因数据并提供序列比对服务^[64,65]; 系统生物工程重点实验室利用 2 个群体感应信号转导回路, 设计并构建了一个合成的生态系统, 改变该系统的环境因素将形成不同的群体效应, 如灭绝、强制互利共生、兼性互利共生和偏利共生^[66]; 清华大学教育部生物信息学重点实验室将控制理论和逆向工程学原理运用到通路动态设计中, 实现了代谢通路的逆向工程设计, 一方面模拟了 *E. coli* 的趋化行为, 另一方面, 也为理解通路的设计原理提供了帮助^[67]; 北京大学 2007 年 iGEM 团队在获奖后继续了他们的参赛课题, 根据合成生物学的基本原理, 以理论生物学为指导, 设计并合成了一个由多个模块组成的新的遗传时序逻辑线路——按钮式开关(push-on push-off switch). 该按钮式开关由一个双稳态开关存储模块和一个双抑制启动子或非门模块组成, 能够根据自身内部状态对同样的输入产生不同的输出, 并能够“记忆”这个输出^[24]. 中国科技大学开发并论证了一种人工转录元件的通用化设计策略^[68], 为合成生物学基本元件的重复利用和组合设计提供了依据. 此外, 我国科学家积极参与合成生物学国际合作研究. 如中国科学院心理研究所于 2007 年参与欧盟第六框架计划合成生物学前沿研究(Programmable Bacterial Catalysts, PROBACTYS), 作为 7 个项目参与方中唯一一个来自非欧洲国家的研究团队, 在重要微生物全基因组水平代谢网络重构方面做出了重要贡献; 同时, 在国家自然科学基金的支持下, 系统开展最小基因组研究, 界定了重要模式微生物恶臭假单胞菌的必需基因和最小基因组(文章准备中).

我国的在校大学生也积极投身合成生物学的学

习和研究中. 近几年来, 北京大学、清华大学、中国科学技术大学、天津大学、上海交通大学等学校的在校学生积极参与了由美国麻省理工学院发起和组织的国际遗传工程机器设计大赛(iGEM), 并在这一合成生物学创新设计大赛中取得了骄人的成绩, 这为中国合成生物学未来的发展培养了年轻力量.

中国科学家是合成生物学起步的先驱, 曾做出过人工合成胰岛素、tRNA 等举世闻名的成就. 中国的科学技术发展已经使得我们具备开展合成生物学研究的基础和优势. 合成生物学的核心之一——基因组科学已在华大基因研究院等机构的带动下, 通过参加 1% 人类基因组计划, 在短短的 10 年中已使中国在该领域跃居国际前三的地位, 并快速向国际第一、第二的位置冲击, 为提高我国在合成生物学研究领域的国际竞争力奠定了坚实的基础. 蛋白质组学和蛋白质结构学也已跃居国际前沿行列. 此外, 在基因多联密码、肽核酸、新型多肽等生命基本物质的人工合成或制造技术上都有了很有成效的探索. 生物信息学、系统生物学、基因组学等各种组学研究、基因工程、代谢工程等技术生物能源、生物材料、生物基化学品、生物催化剂等工业生物技术领域广泛应用, 并已取得了一系列重要的成果, 相关技术及产业发展正在直逼国际领先水平. 已经建立的微流控和纳米等前沿工程技术也为合成生物学的发展提供了坚实的工程技术基础.

综上, 我国已具备合成生物学研究发展的技术、人才优势, 但需进一步凝练研究目标、凝聚科研团队, 在国家层面的指导和资助下, 不断促进合成生物学在我国的发展.

4 合成生物学面临的机遇与挑战

合成生物学研究所取得的成绩, 已经初步显示了这一学科巨大的应用前景及其可能对人类社会产生的重大影响. 合成生物学的发展一方面促进了各个学科领域的交叉综合, 带来了技术的进步; 另一方面, 合成生物学的成果有望在多个领域改变人类的生活, 如廉价的药物、疾病的快速诊断、肿瘤的检测与治疗、高效生产的清洁能源、可持续的空气净化、大幅提高的农作物产量等. 然而, 这些目标的实现仍需来自各个领域科学家们的持续探索和努力. 目前, 合成生物学仍面临着诸多挑战, 需要逐一克服.

4.1 技术挑战

合成生物学仍面临着一些技术挑战,如生物元件标准化有待进一步完善;仍有许多功能模块尚未确定;生物模块之间及模块与“底盘”细胞之间的兼容性不可预测,复杂性难以处理;定位于全基因组水平网络模型的建立及分析工具有待改进等^[69,70]。问题的核心在于对生命功能“部件”了解尚不充分,对生命体系缺乏系统性、全局性的认识。人类基因组计划为生物学研究引入了“组学”的理念和方法,即规模化、系统化、全局化,并随之产生了各种组学研究和数据(如转录组、蛋白质组)。各种组学研究促进了相关学科领域的突破性进展,组学数据也为合成生物学研究提供了重要的基础。生命是一个巨大而复杂的网络系统,代谢、转录调控、信号转导等各种网络系统之间存在着复杂的沟通、调节和控制机制。因此,需突破传统的基因工程或代谢工程“局部化”研究的局限,充分利用各种组学数据,构建“全基因组水平”网络模型,以实现生物体系统的、全局的认识;以此为基础,开展对生物体的改造与设计,将是解决合成生物学问题和挑战的关键。

另一方面,如何将现有的合成生物学研究成果高效地组织及利用起来,也是促进合成生物学快速发展的因素之一。例如,如何更加有效地规范生物元件的标准化,如何对已设计出的生物模块进行综合管理,如何实现模块的设计、构建技术与合成基因组学技术的相互结合等。此外,在生物模块研究方面,合成生物学发展的前10年,从生物元件的标准化开始,大多数研究集中在单个生物模块的设计与构建上。合成生物学的未来有望在系统层次上有更进一步的发展,即从现有的单个模块出发,通过将不同功能的简单模块进行合理、有目的的组合,使其发挥更为复杂的作用:如通过耦合多个模块构建出消耗污染物同时产生绿色能源的生物系统或通路,或构建出能够探测并杀死肿瘤细胞的生物系统等^[71]。同样,承载这些模块和系统的“底盘”研究也是合成生物学未来一段时期发展的一个重要方向和挑战。最小基因组的研究,不仅能够为所设计的模块和系统提供理想的底盘,同时也是一个探索生命未知的重要过程。

4.2 社会及伦理问题

科学是一把双刃剑,合成生物学可能带来的风

险同它美好应用前景一样受到人们的关注。提到“重构生命”,大多数人会联想到“上帝”。对于人类扮演“上帝”的角色,一些人表示担忧。尤其是在2008年,Becker等人^[58]使原本不具备人类感染力的蝙蝠SARS病毒变成感染人的强毒株后,人们不禁恐慌,若是这类技术被用于生物武器的开发,或者被恐怖主义者掌握,后果会怎样?2010年,J. Craig Venter及其团队^[1]在人工合成细胞方面取得的进展使得人们不禁要问,距离“人造生命”还有多远?合成生物学正是在这样的争议中不断接受着社会及伦理问题的审查。J. Craig Venter于2010年5月27日在美国国会的证词中指出,他们有关合成细胞的所有工作都是在严格的社会及伦理道德审查下进行的。他们将伦理道德和社会影响视为与科学研究同等重要,并多次举办座谈会、研讨会对相关问题进行交流和政策商讨。

对于合成生物技术,从技术层面来讲,科学家对此已有预见和防范手段。例如,对于构建的新物种,可以通过设计基因开关,限制其向不利的方面发展;可以设计所谓的“自杀基因”,确保合成的细菌细胞不能在实验室外或其他特定的环境下存活;一些工程细菌,到一定的时候,让其自然灭亡,而不会对人类社会和环境造成危害。从社会层面来讲,应将生物安全和生物防护提上日程,首先,相关部门加强管理,包括法律上的管理;其次,科学家履行责任,防止对这一技术的误用;最后,使公众对科学信息具有全面而真实的了解,防止不必要的恐慌(<http://world.people.com.cn/GB/57507/11806145.html>)。美国相关道德委员会对合成生物学当前的发展评估结果显示,合成生物学当前不会产生巨大不可预期的破坏影响,但应长期关注,随时制定和实施适当的保障措施。对于生物合成技术,应看到其发展会造福人类,对其造成的风险和生命伦理方面的问题,应正确地加以评估并科学地管理控制。未来合成生物学的发展,必然将接受各种社会、伦理及道德的审查,其管理和规范也将随之而进一步完善——这是这个学科发展的特点之一,同时也是促进这一学科发展的动力之一。

5 总结与展望

可以预期,在不久的将来,人类有望通过合成生物技术建立的人工叶片大量消耗导致全球气候变暖的二氧化碳,同时产生新能源;利用人工制造的超级

甲烷菌、超级产油菌源源不断地生产清洁燃料,而采用的原料是可循环再生的物质,而不是日益匮乏的石油基原料;通过合成生物学技术发展的各类超级计算机、超级电池、新型体内医学机器人等技术和产品将彻底改善人和环境的友好协调关系,推动产业结构全面升级进入绿色制造时代,提高人类社会的文明水平,加快人类进入生物经济时代的步伐,为人类带来巨大财富和福祉。

合成生物学在我国尚属新兴学科,尚处于萌芽阶段。如何充分利用目前国际上已经取得的研究进展,并在此基础上对合成生物学目前存在的问题和挑战进行创新性、突破性探索,系统建立我国合成生物学研究平台和技术体系,是我国目前合成生物学研究技术层面亟待解决的重要问题。同时,我们应结合国家重大需求,系统开展面向特定应用的合成生物学研究,以解决社会需求为根本出发点,在实践探索中逐步实现我国合成生物学研究与国际的接轨和进一步超越。合成生物学是一门交叉学科,

我国各领域科学家应加强交流与合作,充分发挥已有的技术、人才优势,在合成生物学领域开拓出具有中国特色的研究道路。目前我国尚无针对合成生物学社会及伦理影响审查的权威机构,这将在一定程度上影响未来我国合成生物学研究的成果在国际上的推广。

我们可喜地看到,今年 10 月,科技部已对合成生物学研究进行具体部署,将合成生物学列入“973”计划重大科学问题之一。在此,我们呼吁并期待我国不断加强该领域国家发展战略的研究和规划力度,继续加大投入,引导并通过机制创新加快推动我国合成生物学的快速发展,提高竞争力,使我国早日进入国际领先行列。中国科学家将有能力也有毅力挑战这一新兴学科,使我国在新一轮科技和经济热潮中立于不败之地。可以预见,合成生物学将会给我国生物技术、环境、新能源、医学领域带来很多好处并产生巨大的经济效益,对促进我国社会和经济的发展具有极其重大和深远的战略意义。

参考文献

- Gibson D G, Glass J I, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329: 52—56
- The Royal Academy of Engineering. *Synthetic Biology: Scope, Applications and Implications*. London: The Royal Academy of Engineering, 2009
- Benner S A, Sismour A M. Synthetic biology. *Nat Rev Genet*, 2005, 438: 533—543
- Heinemann M, Panke S. Synthetic biology—Putting engineering into biology. *Bioinformatics*, 2006, 22: 2790—2799
- Leonard E, Nielsen D, Solomon K, et al. Engineering microbes with synthetic biology frameworks. *Trends Biotechnol*, 2008, 26: 674—681
- Kitney R I. Synthetic biology—engineering biologically-based devices and systems. In: Jarm T, Kramar P, Zupanec A, eds. *11th Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing (MEDICON 2007)*, Jun 26—30, 2007, Ljubljana, Slovenia. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2007. 1138—1139
- Khalil A S, Collins J J. Synthetic biology: Applications come of age. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 367—379
- Koonin E V. How many genes can make a cell: The minimal-gene-set concept. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2000, 1: 99—116
- Szathmáry E. Life: In search of the simplest cell. *Nature*, 2005, 433: 469—470
- Gardner T S, Cantor C R, Collins J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403: 339—342
- Elowitz M B, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, 403: 335—338
- Editorial. Ten years of synergy. *Nature*, 2010, 463: 269—270
- Yokobayashi Y, Weiss R, Arnold F H. Directed evolution of a genetic circuit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 16587—16591
- Elowitz M B, Levine A J, Siggia E D, et al. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 2002, 297: 1183—1186
- Martin V J, Pitera D J, Withers S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 796—802
- You L, Cox R S, Weiss R, et al. Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature*, 2004, 428: 868—871
- Kramer B P, Viretta A U, El Baba M D, et al. An engineered epigenetic transgene switch in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 867—870

- 18 Basu S, Gerchman Y, Collins C H, et al. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, 2005, 434: 1130—1134
- 19 Chen M T, Weiss R. Artificial cell-cell communication in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using signaling elements from *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1551—1555
- 20 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440: 940—943
- 21 Deans T L, Cantor C R, Collins J J. A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells. *Cell*, 2007, 130: 363—372
- 22 Rinaudo K, Bleris L, Maddamsetti R, et al. A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 795—801
- 23 Win M N, Smolke C D. A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 14283—14288
- 24 Lou C, Liu X, Ni M, et al. Synthesizing a novel genetic sequential logic circuit: A push-on push-off switch. *Mol Syst Biol*, 2010, 6: 350
- 25 Bronson J E, Mazur W W, Cornish V W. Transcription factor logic using chemical complementation. *Mol Biosyst*, 2008, 4: 56—58
- 26 Zhang Y H P, Evans B R, Mielenz J R, et al. High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway. *PLoS ONE*, 2007, 2: e456
- 27 Steen E J, Kang Y S, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463: 559—562
- 28 Fraser C M, Gocayne J D, White O, et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 1995, 270: 397—403
- 29 Mushegian A R, Koonin E V. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10268—10273
- 30 Koonin E V. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nat Rev*, 2003, 1: 127—136
- 31 Akerley B J, Rubin E J, Novick V L, et al. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 966—971
- 32 Glass J I, Assad-Garcia N, Alperovich N, et al. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 425—430
- 33 Jacobs M A, Alwood A, Thaipisuttikul I, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14339—14344
- 34 Kobayashi K, Ehrlich S D, Albertini A, et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 4678—4683
- 35 Liberati N T, Urbach J M, Miyata S, et al. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2833—2838
- 36 Ji Y, Zhang B, Van S F, et al. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science*, 2001, 293: 2266—2269
- 37 Zhang Y, Thiele I, Weekes D, et al. Three-dimensional structural view of the central metabolic network of *Thermotoga maritima*. *Science*, 2009, 325: 1544—1549
- 38 Fehér T, Papp B, Pál C, et al. Systematic genome reductions: Theoretical and experimental approaches. *Chem Rev*, 2007, 107: 3498—3513
- 39 Zhang L, Chang S, Wang J. How to make a minimal genome for synthetic minimal cell. *Protein Cell*, 2010, 1: 427—434
- 40 Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2006, 2, doi: 10.1038/msb4100050
- 41 Sung B H, Lee J H, Kim S C. *Escherichia coli* genome engineering and minimization for the construction of a bioengine. In: Lee S Y, ed. *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Daejeon: Springer, 2009. 19—40
- 42 Goryshin I Y, Naumann T A, Apodaca J, et al. Chromosomal deletion formation system based on Tn5 double transposition: Use for making minimal genomes and essential gene analysis. *Genome Res*, 2003, 13: 644—653
- 43 Yu B J, Sung B H, Koob M D, et al. Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted *Cre/loxP* excision system. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1018—1023
- 44 Kolisnichenko V, Plunkett G, Herring C D, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res*, 2002, 12: 640—647
- 45 Posfai G, Plunkett G 3rd, Feher T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312: 1044—1046
- 46 Mizoguchi H, Mori H, Fujio T. *Escherichia coli* minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46: 157—167
- 47 Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, et al. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol*, 2005, 55: 137—149

- 48 Westers H, Dorenbos R, van Dijk J M, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 2076—2090
- 49 Ara K, Ozaki K, Nakamura K, et al. *Bacillus* minimum genome factory: Effective utilization of microbial genome information. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46: 169—178
- 50 Morimoto T, Kadota R, Endo K, et al. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res*, 2008, 15: 73—81
- 51 Suzuki N, Nonaka H, Tsuge Y, et al. Multiple large segment deletion method for *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69: 151—161
- 52 Giga-Hama Y, Tohda H, Takegawa K, et al. *Schizosaccharomyces pombe* minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46: 147—155
- 53 Murakami K, Tao E, Ito Y, et al. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 589—597
- 54 Agarwal K L, Büchi H, Caruther M H, et al. Total synthesis of gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*, 1970, 227: 27—34
- 55 Cello J, Paul A V, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 2002, 297: 1016—1018
- 56 Smith H O, Hutchison C A, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: Φ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15440—15445
- 57 Kobasa D, Takada A, Shinya K, et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 2004, 431: 703—707
- 58 Becker M M, Graham R L, Donaldson E F, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 19944—19949
- 59 Hutchison C A, Peterson S N, Gill S R, et al. Global transposon mutagenesis and a minimal mycoplasma genome. *Science*, 1999, 286: 2165—2169
- 60 Lartigue C, Glass J I, Alperovich N, et al. Genome transplantation in bacteria: Changing one species to another. *Science*, 2007, 317: 632—638
- 61 Gibson D G, Benders G A, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, 319: 1215—1220
- 62 Gibson D G, Benders G A, Axelrod K C, et al. 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: 20404—20409
- 63 Lartigue C, Vashee S, Algire M A, et al. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science*, 2009, 325: 1693—1696
- 64 Zhang R, Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D455—D458
- 65 Zhang R, Ou H, Zhang C. DEG: A database of essential genes. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: D271—D272
- 66 Hu B, Du J, Zou R Y, et al. An environment-sensitive synthetic microbial ecosystem. *PLoS ONE*, 2010, 5: e10619
- 67 Luo J, Wang J, Ma T M, et al. Reverse engineering of bacterial chemotaxis pathway via frequency domain analysis. *PLoS ONE*, 2010, 5: e9182
- 68 Zhan J, Ding B, Ma R, et al. Develop reusable and combinable designs for transcriptional logic gates. *Mol Syst Biol*, 2010, 6: 388
- 69 Kwok R. Five hard truths for synthetic biology. *Nature*, 2010, 463: 288—290
- 70 Alterovitz G, Muso T, Ramoni M F. The challenges of informatics in synthetic biology: From biomolecular networks to artificial organisms. *Brief Bioinform*, 2010, 11: 80—95
- 71 Purnick P E M, Weiss R. The second wave of synthetic biology: From modules to systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 410—422