以非天然核酸为遗传物质的人工生命构建

白艳芬, 聂朋, 熊成鹤, 温骏林, 甘海云, 马晴, 胡政, 李雪飞, 于涛, 黄建东*, 梅辉*

中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 广东省合成基因组学重点实验室, 深圳合成基因组学重点实验室, 深圳 518055

* 联系人, E-mail: jd.huang@siat.ac.cn; hui.mei@siat.ac.cn

2020-06-08 收稿, 2020-07-18 修回, 2020-07-20 接受, 2020-07-21 网络版发表

国家重点研发计划(2019YFA0904001)、广东省合成基因组学重点实验室项目(2019B030301006)、深圳合成基因组学重点实验室项目(ZDSYS201802061806209)、深圳市科技创新委员会项目(KQTD2015033117210153)和深圳合成生物学创新研究院科研基金(ZTXM20190005, ZTXM20190020)资助

摘要 合成生物学/工程生物学通过设计、搭建生物部件甚至生物系统来构建具有新功能的人工生命。其研究内容主要分为3个层次: (1) 将现有的天然生物模块进行设计和组装, 构建不同于天然存在的调控网络, 从而实现新功能; (2) 通过人工基因组DNA的全合成进行新生命的构建; (3) 通过化学合成部件(修饰核酸、蛋白质、脂类等)创建全新的生物系统乃至生命体。第3个层次的研究也称为化学合成生物学, 本文主要集中讨论化学合成生物学中将非天然核酸替代DNA作为遗传物质从而构建人工生命的研究, 简要介绍了非天然核酸化学修饰对其遗传物质功能的影响, 及以其为基础的人工生命构建的研究现状。这将为我们探讨生命起源、进化甚至外星生命等问题提供新的思路。

关键词 合成生物学, 非天然核酸, 遗传物质, 人工生命, 新生命形式

近年兴起的合成生物学主要通过对自然生命系统中存在的各种不同功能的基因部件进行设计、改造、重新组合, 甚至从头合成, 从而构建出具有新功能的生命形式。合成生物学一般通过工程化的理念来进行设计, 首先需要将各个基因功能部件进行标准化切割、划分, 使其模块化, 以便于后续更加多样化、灵活地进行组合和搭配, 最终实现程序化的途径搭建与相关功能的工程菌株构建。这个过程类似于计算机领域的标准化流程, 各个模块之间既可互相独立, 又能随机串联在一起, 以此实现多种不同的功能。这些由天然核酸DNA组成的基本模块就是合成生物学家的生物语言。本质上, 合成生物学仍是DNA重组技术的外延、细化以及程式化应用, 是对基因及各种功能DNA片段的设计与重组。

除了天然DNA以外, 自然界中还存在着一些非常规的修饰核酸, 如在噬菌体DNA中发现的修饰碱基, 这些修饰碱基改变了噬菌体DNA的物理和化学特性, 同时也极大地改变了序列异构DNA分子的生物行为, 增加了非结合区的热稳定性等^[1]。与噬菌体类似地, 螺旋藻(*Gyrodinium cohnii*)中也存在修饰碱基替换天然碱基的现象, 该菌对哺乳动物细胞具有极强的杀伤作用^[2]。这些修饰核酸通常在调控转录和限制性修饰系统中发挥着重要作用^[3,4]。

这给化学合成生物学家一个启示, 是否可以用非天然核酸替代天然核酸作为遗传物质进行生命活动? 是否可以利用非天然核酸作为新的语言来构建自然界不存在的全新生命形式? 研究的核心问题在于人工合成的核酸分子能否与天然DNA分子一样具有分子自组

引用格式: 白艳芬, 聂朋, 熊成鹤, 等. 以非天然核酸为遗传物质的人工生命构建. 科学通报, 2021, 66: 347–355

Bai Y F, Nie P, Xiong C H, et al. Construction of synthetic life forms with genetic materials comprising unnatural nucleic acids (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 347–355, doi: [10.1360/TB-2020-0474](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0474)

装、复制、转录及进化等生物功能。事实上,化学家通过对核酸结构的3个部分(磷酸、糖环和碱基)进行修饰,合成了一系列非天然核酸,通过研究其结构和配对性质、稳定性、酶识别能力等,部分掌握了其遗传信息传递和进化的关键分子特征^[5-7]。研究表明,一些修饰核酸具有天然DNA类似的遗传物质储存、传递和进化的功能,其在体外的复制、转录等相关研究在很多综述中有详细和精彩介绍^[7-11]。然而在活细胞内,具有该特征的非天然核酸能否真正作为遗传物质发挥功能仍是未解之谜。科学家对这一方向进行了初步探索,本文将对非天然核酸在体内执行或者应用的典型例子进行简要介绍,并对非天然核酸为基础的人工生命构建进行总结和展望。

1 非天然核酸简介

科学家合成和研究了很多类型的非天然核酸,一般从两个不同的目的出发:(1)核酸药物开发角度,通过非天然核酸来改善核酸类药物(包括反义核酸、小干扰核酸、核酸适配体和核酸酶等)的理化性质、靶向性、生物稳定性等适药能力,如用于杜氏肌营养不良症治疗的反义核酸药物Eteplirsen^[12]、治疗巨细胞病毒(cytomegalovirus)性视网膜炎的Fomivirsen^[13]均具有非天然核酸修饰。(2)从化学角度研究“为什么自然选择了DNA/RNA作为生命的遗传物质?”此类有关生命起源的问题及其在合成生物学中的应用。通过对核酸结构的三个组成部分(磷酸、糖环和碱基基团)进行改造,化学合成得到非天然核酸(图1),研究其结构和功能,确定了其作为遗传物质的一些关键因素:磷酸修饰能影响核酸的表型特征,碱基修饰会影响甚至改变配对特性,可以人工构建“非天然碱基对”以扩展遗传字母表^[14]。而替代糖环单元的研究显示,并不是所有糖环替代的异源核酸都可以与DNA/RNA或者自己形成稳定双链结构^[5]。糖环结构决定了双螺旋的几何结构,只有部分异源核酸,比如TNA、HNA等可以通过Watson-Crick碱基对与天然核酸DNA/RNA形成稳定双螺旋。异源核酸中的遗传信息读取,即复制和转录过程使天然DNA/RNA聚合酶面临着严峻考验。通常需要人工进化的核酸聚合酶来完成相应的工作^[15-19]。随着核酸修饰程度增加,与天然核酸的区别度变大,非天然核酸在生物体内作为遗传物质的挑战性也随之增加。目前,利用非天然核酸替代天然核酸作为遗传物质,进而构建异源生命的研究还处在起步阶段,下文将选取一些相关

研究进行介绍。

2 以非天然核酸为遗传物质的人工生命构建研究

2.1 磷酸修饰的非天然核酸

硫代磷酸酯键是磷酸修饰的常见类型,与天然磷酸酯键相比,硫代磷酸酯键具有抗核酸酶活性,使其在体内不易受核酸降解酶的影响,同时还能促进体内细胞摄取和生物利用度^[20]。因此,磷酸修饰核酸已经应用于寡核酸治疗中,当今大多数治疗性寡核酸都包含这种修饰。比较奇特的是,在细菌DNA中也发现了硫代磷酸酯基团,其功能也正在研究中^[21]。研究显示,该氧硫交换修饰是由*dndABCDE*基因编码的蛋白催化进行的^[22],并与蛋白DndFGH在某些细菌中形成防御屏障^[23],可以区别并攻击非硫代磷酸酯修饰的外源DNA片段,与基于DNA甲基化^[24]的限制修饰系统类似。基于此,硫代磷酸酯与天然磷酸酯仅有一个原子的区别,理论上可以有效作为备选遗传物质用于人工生命的合成。

此外,Brown实验室利用click反应将寡核酸连接起来,在DNA序列中掺入triazole DNA,并且发现修饰之后的DNA可以被体内的核酸聚合酶识别,从而完成复制和转录,进而表达相应的蛋白(图2)^[25]。click DNA连接在大肠杆菌非必需基因中的生物相容性说明,利用click DNA连接构建化学修饰非酶催化的基因及基因组组装是可行的^[26]。该非天然click DNA连接在人类细胞中成功地编码了红色荧光蛋白,且从上述细胞中分离出mRNA并进行反转录得到了正确的cDNA序列,这是在真核细胞中首次使用非天然连接的DNA^[27]。

2.2 碱基修饰的非天然核酸

相对于糖环修饰的核酸需要改造核酸聚合酶来读取遗传信息,碱基修饰的DNA类似物可以利用内源性的聚合酶完成相应的功能,从而在活细胞体内实现复制和转录。Romesberg课题组^[28]甚至实现了非天然碱基对在体内的复制、转录和翻译成蛋白质的工作。

2.2.1 DZA片段的复制

目前,Herdewijin实验室已经实现了几种碱基修饰的核酸构建,其主要集中在碱基的杂环中引入一个卤族元素,如氟、氯、溴等,或者引入一个甲基(图3)^[29,30],这类4种碱基全被修饰的DNA也被称为DZA^[7]。

图 1 (网络版彩色)DNA与非天然核酸结构图。(a) DNA包含3个部分:糖基基团(绿色)、碱基基团(蓝色)以及磷酸基团(红色);(b)~(d) 磷酸修饰;(e)~(h) 碱基修饰;(i)~(l) 糖环修饰

Figure 1 (Color online) Structures of DNA and xeno-nucleic acids. (a) Structure of DNA, including sugar moieties (green colored), nucleobases (blue colored) and phosphodiester linkages (red colored); (b)~(d) phosphate-modified XNAs; (e)~(h) nucleobase-modified XNAs; (i)~(l) sugar-modified XNAs

作者认为,在DNA中,N表示碱基(ATGC),四种碱基全部被修饰物替代,故称为DZA。DZA作为合成生物学和生物学技术的一个强大工具,具有多种功能,包括用于生产多种DZA文库、构建全修饰的PCR片段和控制酶切位点及作为基因模板的合成,表明修饰核酸可以作为天然核酸的替代物^[30]。实际上,在体外,利用上述DZA作为模板成功实现了复制,同时在体内也实现了部分基因组的替代。在大肠杆菌中,DZA作为模板首先被复制为天然DNA,然后用来转录RNA,进而被翻译为功能蛋白(图3)。

Kool实验室的相关研究^[31,32]将包含单个及多个碱

基环扩大的xDNA的绿色荧光基因连接在质粒中,并转化进入大肠杆菌,成功得到了产绿色荧光蛋白的菌落。研究表明,多达4个连续的非天然核酸的插入依然可以在体内实现功能基因的表达。

2.2.2 非天然碱基对(unnatural base pair, UBP)

科学家对碱基进行大幅度改造,创造了新的碱基对,从而扩展了遗传字母表^[30,33],为人工生命的构建奠定了基础。在这些碱基对中,研究人员设计了基于氢键配对的新型碱基对(iso-C/iso-G)^[34],并改变了氢键供体和受体模式^[28,35]。Zhang等人^[36]研发了利用空间位阻及分子间疏水作用力的新型碱基对dNaM-d5SICS和

图2 (网络版彩色)磷酸修饰核酸体内实验示意图. 在大肠杆菌中, 将通过“click”反应连接起来的含有8个triazole DNA的绿色荧光蛋白基因进行克隆、转录和翻译

Figure 2 (Color online) *In vivo* experiments of phosphate-modified XNAs. The cloning, transcription and translation of iLOV gene with 8 triazole DNA nucleotides which are assembled through ‘click’ reaction

图3 (网络版彩色)碱基修饰核酸体内实验示意图. 在大肠杆菌中, 有DZA掺入的基因tmpR的转录及翻译

Figure 3 (Color online) *In vivo* experiments of base-modified XNAs. The *in vivo* transcription and translation of DZA containing tmpR gene in *E. coli*

dNaM-dTPT3. Okamoto等人^[37]也开发了一些疏水性的碱基对, 如Ds-Px等. 这些新型碱基对可对DNA和RNA的位点进行特异性标记, 用于疾病诊断、DNA数据储存、DNA条形码、自组装纳米结构, 以及使用非常见氨基酸构建蛋白质等领域^[38], 同时也为构建具有扩展密码DNA的半合成生命提供了多种选择.

然而, 将非天然碱基对掺入到天然细胞构建半合

成生命, 需要克服许多难题. 首先, 在细胞内必须存在非天然的核苷三磷酸; 其次, 内源性聚合酶必须能够使用非天然的核苷三磷酸, 在复杂的细胞环境中忠实地复制包含UBP的DNA; 最后, UBP必须在维持DNA完整性途径的存在下保持稳定. Romesberg实验室^[36]解决了上述问题, 成功地将非天然核酸对d5SICS:dNaM引入质粒中并在大肠杆菌体内进行了准确复制, 且细菌

自身的DNA修复系统不能有效地切除UBP, 但是该半合成生命生长缓慢, 即使在特定条件下生长也无法长期保留非天然碱基对(图4)。于是, 对该半合成生命进行了进一步改造, 主要包括对转运蛋白的改造, 同时还引进了Cas9系统, 及时将丢失了非天然核酸的菌株剔除出系统, 从而得到了生长更为稳健的半合成生命体, 可以稳定地利用3对碱基对进行遗传信息传递。该细菌成为第一个能稳定应用非天然核酸对进行复制的生物, 可惜的是, 它并不包含转录和翻译能力。随后, 该实验室用一对新的UBP进行了更加完整的半合成生命体的构建(图4)。首先, 通过异源表达三磷酸转运蛋白将非天然核苷三磷酸运输到大肠杆菌体内作为DNA复制的原料; 与此同时, 构建一个质粒, 其中包括含有一对非天然碱基对(dNaM-dTPT3)的*sfGFP*基因, 以及一个非天然转运RNA; 随后, 在培养基中添加非天然氨基酸使其与非天然转运RNA相结合并应用于后续的蛋白质翻译中; 经过一系列改造之后, 成功实现了在大肠杆菌体内利用UBP进行遗传信息传递并表达目标蛋白的目的。该研究实现了非天然碱基对在体内的复制、转录和翻译工作, 有效地扩增了遗传信息, 为人工合成生命及其下游应用研究奠定了坚实的基础^[28]。

在最新的研究进展中, Romesberg等人^[39]首次成功构建了含有67个密码子的人工生命, 包含有9个非天然密码子可以将非天然的氨基酸编码至非天然的蛋白质中, 其中至少3个非天然密码子与天然系统正交, 可与天然密码子系统共存, 在翻译过程中插入多个不同种类的非天然氨基酸, 从而合成具有不同形式、不同功能的蛋白质和人工生命。

2.2.3 细菌基因组水平碱基替代

Schutz实验室^[40,41]利用代谢通路改造的方法, 成功构建了5-羟甲基尿嘧啶替代天然胸腺嘧啶的大肠杆菌菌株, 替代率达到70%以上(图5)。5-羟甲基尿嘧啶是非经典的碱基修饰, 在天然噬菌体基因组中存在。而Mutzel实验室^[42]通过化学进化的方法, 得到了5-氯尿嘧啶替代胸腺嘧啶的大肠杆菌菌株。首先, 通过基因敲除构建了一株胸腺嘧啶依赖菌株; 然后, 在培养基中调节胸腺嘧啶与5-氯尿嘧啶的比例给大肠杆菌施加生长压力; 最终, 通过25周的进化筛选得到了一株菌株, 其中5-氯尿嘧啶的含量达到98.4%(图5)。此类研究表明, 在大肠杆菌中可以利用非天然碱基替代天然碱基的遗传信息传递功能, 从而证实了在基因组水平改变遗传物质的可行性。即便是仅仅一个氯原子的取代, 替换的突变菌

图4 (网络版彩色)含有非天然碱基对的半合成人工生命

Figure 4 (Color online) Construction of semi-synthetic organisms with hydrophobic UBPs

图5 (网络版彩色)化学替换大肠杆菌基因组示意图。图中红色点代表化学修饰碱基替换了基因组中的胸腺嘧啶

Figure 5 (Color online) Replacement of the entire *E. coli* genome with modified nucleobases. The thymidine was replaced by chemically modified bases

株中也检测到1514个突变,表明全基因组水平的异源核酸替换具有相当的挑战性。

2.3 糖基修饰的异源核酸

糖基修饰的核酸虽然可以保证天然碱基配对原则,但是在结构上仍与天然核酸有较大差异,常规情况下,天然DNA聚合酶不能识别糖基修饰的核酸。其体外研究大都是通过对DNA聚合酶改造进化,从而实现以DNA为模板的异源核酸复制。在特殊情况下,糖基修饰的核酸也有在大肠杆菌体内进行功能基因的表达。例如, Herdewijn实验室^[43]研究表明, 12个连续的HNA或CeNA核酸或9个ANA核酸可以由大肠杆菌复制机制进行读码;该实验同时说明在没有规范性的骨架及碱基配对的时候,遗传信息依然可以正确传递,也预示着在细菌细胞内除了DNA和RNA之外可能还存在第三种核酸传递系统(图6(a))。近期,该实验室将tPhoNA作为模板在大肠杆菌体内进行复制,结果表明,单个修饰的非天然核酸可以很好地适应大肠杆菌自身的复制系统,但是多个连续的非天然核酸的出现会极大地降低DNA复制效率^[44]。与此同时,该课题组还设计了一种新型的tPhoNA合成酶,与先前报道的逆转录酶一起证明了tPhoNA是一种可行的遗传材料^[45]。在最新研究的新型修饰核酸ZNA中,由于一个手性中心的存在,ZNA包含2个对映异构体(S)-ZNA和(R)-ZNA。(S)-ZNA与互补的单链DNA相互作用较弱,但其自身杂交较强,展示了其化学正交性。从生物学上讲,(S)-ZNA的二磷酸酯单体可以被*E. coli*聚合酶I识别。ZNA到DNA的复制‘转

译’在*E. coli*细胞中实现,证明了ZNA可以作为潜在的遗传物质使用^[44]。

上述研究表明,糖环修饰的异源核酸可以在体内通过复制完成遗传信息从异源核酸到DNA的传递,而更简单的修饰核酸可以完成直接转录过程。Matsuda实验室^[46]合成了一种糖基修饰的非天然核酸——4'-硫代核酸(4'-thioDNA),将天然核酸中呋喃糖环中的氧原子替换成了硫原子;该非天然核酸具有核酸酶抗性并具有杂交性,随后的实验证明其可以作为KOD DNA聚合酶的模板,不仅在体内同时也可以可以在哺乳动物细胞中作为RNA聚合酶的转录模板实现转录,首次证明了糖基修饰的非天然核酸的体内转录潜力。随后,4'-硫代核酸掺入DNA链可以作为RNA聚合酶的模板,成功进行转录实验;该实验室将一段含有42个4'-硫代核酸与天然核酸的荧光素酶基因在老鼠细胞中成功表达,为含有4'-硫代核酸遗传系统的构建提供了重要依据^[47]。

Schultz实验室^[41]对大肠杆菌基因组进行了部分替换,在用5-羟甲基-2'-脱氧胞苷(5hmC)替换2'-脱氧胞苷实验中,意外得到了由DNA和RNA组成的嵌合体基因组,也直接证实了RNA作为遗传物质的可能性,而该嵌合体的获得也让我们对RNA和DNA的起源相互关系有了更深入的了解。这样意外的发现也为基因组水平完全异源核酸替代天然DNA提供了新的研究思路。

以上研究表明,细胞可以兼容各种不同糖基修饰核酸进行遗传信息传递。尽管只是有限的几种糖基修饰核酸且链长也有限制,但是随着对新型XNA聚合酶

图6 (网络版彩色)糖环修饰核酸体内实验示意图。(a) 在大肠杆菌中HNA和CeNA成功进行了转录及翻译。(b) 在哺乳动物细胞中,将一个4'-thioDNA插入U6启动子及shRNA并成功转录shRNA进行了基因沉默

Figure 6 (Color online) *In vivo* experiments of sugar-modified XNAs. (a) The successful transcription and translation of HNA and CeNA in *E. coli*. (b) A 4'-thioDNA was incorporated into a plasmid which then transfected mammalian cells to produce shRNA with gene silencing function

的发现及改造,我们相信将来会有更多的可能性来构建以异源核酸为基础的人工生命。

3 总结与展望

合成/工程生物学家利用DNA作为“生命机器”的语言,书写新的生命密码,实现新的生命功能,扩展了生命维度。但是化学合成生物学家却不满足于此,他们尝试开发以非天然核酸为基础的全新语言,并构建以非天然核酸为基础的人工生命,这将帮助人们更好地理解生命。目前,研究者主要通过对核酸的3个组成部件进行改造,并研究其结构和功能,确定了其作为遗传物质的关键因素。体外研究结果表明,部分非天然核酸具有与DNA类似的遗传物质储存、传递和进化的功能,然而具有此类特征的非天然核酸是否可以用作新遗传物质构建人工生命尚处在初步探索阶段。

在该领域内,研究成果主要集中在碱基修饰核酸在体内的执行或者运转研究,比如,非天然碱基对用于扩增遗传信息,在体内进行复制、转录和翻译工作,从而构建半合成生命;在基因组水平进行非天然碱基的

全替代等。碱基修饰而糖环不修饰,使这类化学修饰核酸与DNA结构类似,进而可以使用现有的核酸聚合酶和核糖体等实现遗传物质的功能。

基于此的半合成人工生命可以理解为天然生命的类似物,而糖环修饰核酸则为我们提供了构建与天然生命差异更大的人造生命的可能性。当糖环修饰的非天然核酸取代了天然核酸之后,即使仍通过A-T、G-C的经典碱基配对来储存和传递遗传信息,天然核酸聚合酶也并不能识别糖环修饰的核酸。通过定向进化等手段得到可以识别非天然核酸的新型聚合酶来进行遗传信息的传递过程,可以得到一套独立于天然系统的遗传信息传递体系。在此基础上,进一步对磷酸和碱基对等进行修饰,结合相关酶定向进化,最终构建与现有生命具有正交性的互不干扰的全新人工生命系统。这样的生命体系能够在改造生命与现有生命之间构建“基因防火墙”,从而提高改造生命的生物安全性。除此之外,全新构建的生命系统将会对我们探索生命与非生命的界限、理解生命本身、理解生命起源和进化提供崭新的视角,甚至会给我们探寻外星生命带来启发。

参考文献

- 1 Warren R A. Modified bases in bacteriophage DNAs. *Annu Rev Microbiol*, 1980, 34: 137–158
- 2 Rae P M. 5-hydroxymethyluracil in the DNA of a dinoflagellate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 1141–1145
- 3 Olinski R, Starczak M, Gackowski D. Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: Oxidatively modified base, epigenetic mark or both? *Mutat Res/Rev Mutat Res*, 2016, 767: 59–66
- 4 Sánchez-Romero M A, Cota I, Casadesús J. DNA methylation in bacteria: From the methyl group to the methylome. *Curr Opin MicroBiol*, 2015, 25: 9–16
- 5 Eschenmoser A. Etiology of potentially primordial biomolecular structures: From vitamin B12 to the nucleic acids and an inquiry into the chemistry of life's origin: A retrospective. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 12412–12472
- 6 Benner S A, Karalkar N B, Hoshika S, et al. Alternative Watson-Crick synthetic genetic systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8: a023770
- 7 Chaput J C, Herdewijn P. What is XNA? *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 11570–11572
- 8 Pinheiro V B, Holliger P. The XNA world: Progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 245–252
- 9 Eremeeva E, Herdewijn P. Non canonical genetic material. *Curr Opin Biotech*, 2019, 57: 25–33
- 10 Zhang Y, Romesberg F E. Semisynthetic organisms with expanded genetic codes. *Biochemistry*, 2018, 57: 2177–2178
- 11 Feldman A W, Romesberg F E. Expansion of the genetic alphabet: A chemist's approach to synthetic biology. *Acc Chem Res*, 2018, 51: 394–403
- 12 Mendell J R, Rodino-Klapac L R, Sahenk Z, et al. Eteplirsén for the treatment of duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 2013, 74: 637–647
- 13 Perry C M, Balfour J A. Fomivirsén. *Drugs*, 1999, 57: 375–380
- 14 Hirao I, Kimoto M. Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma. *Proc Jpn Acad Ser B*, 2012, 88: 345–367
- 15 Ghadessy F J, Ramsay N, Boudsocq F, et al. Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 755–759
- 16 Pinheiro V B, Taylor A I, Cozens C, et al. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science*, 2012, 336: 341–344
- 17 Houlihan G, Arangundy-Franklin S, Holliger P. Engineering and application of polymerases for synthetic genetics. *Curr Opin Biotech*, 2017, 48: 168–179
- 18 Houlihan G, Arangundy-Franklin S, Holliger P. Exploring the chemistry of genetic information storage and propagation through polymerase

- engineering. *Acc Chem Res*, 2017, 50: 1079–1087
- 19 Dunn M R, Otto C, Fenton K E, et al. Improving polymerase activity with unnatural substrates by sampling mutations in homologous protein architectures. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 1210–1219
- 20 Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*, 2014, 24: 374–387
- 21 Wang L, Jiang S, Deng Z, et al. DNA phosphorothioate modification—A new multi-functional epigenetic system in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2019, 43: 109–122
- 22 Zhou X, He X, Liang J, et al. A novel DNA modification by sulphur. *Mol Microbiol*, 2005, 57: 1428–1438
- 23 Xu T, Yao F, Zhou X, et al. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone s-modification in *Salmonella*. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 7133–7141
- 24 Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, 1992, 70: 5–8
- 25 Kukwikila M, Gale N, El-Sagheer A H, et al. Assembly of a biocompatible triazole-linked gene by one-pot click-DNA ligation. *Nat Chem*, 2017, 9: 1089–1098
- 26 Sanzone A P, El-Sagheer A H, Brown T, et al. Assessing the biocompatibility of click-linked DNA in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 10567–10575
- 27 Birts C N, Sanzone A P, El-Sagheer A H, et al. Transcription of click-linked DNA in human cells. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 2362–2365
- 28 Zhang Y, Ptacin J L, Fischer E C, et al. A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information. *Nature*, 2017, 551: 644–647
- 29 Ereemeeva E, Abramov M, Margamuljana L, et al. Chemical morphing of DNA containing four noncanonical bases. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 7515–7519
- 30 Ereemeeva E, Abramov M, Margamuljana L, et al. Base-Modified nucleic acids as a powerful tool for synthetic biology and biotechnology. *Chem Eur J*, 2017, 23: 9560–9576
- 31 Krueger A T, Peterson L W, Chelliserry J, et al. Encoding phenotype in bacteria with an alternative genetic set. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 18447–18451
- 32 Chelliserrykattil J, Lu H, Lee A H F, et al. Polymerase amplification, cloning, and gene expression of benzo-homologous “yDNA” base pairs. *Chembiochem*, 2008, 9: 2976–2980
- 33 Malyshev D A, Dhami K, Lavergne T, et al. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature*, 2014, 509: 385–388
- 34 Switzer C, Moroney S E, Benner S A. Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA. *J Am Chem Soc*, 1989, 111: 8322–8323
- 35 Wang X, Hoshika S, Peterson R J, et al. Biophysics of artificially expanded genetic information systems. Thermodynamics of DNA duplexes containing matches and mismatches involving 2-amino-3-nitropyridin-6-one (**Z**) and imidazo[1,2-*a*]-1,3,5-triazin-4(8H)one (**P**). *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 782–792
- 36 Zhang Y, Lamb B M, Feldman A W, et al. A semisynthetic organism engineered for the stable expansion of the genetic alphabet. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 1317–1322
- 37 Okamoto I, Miyatake Y, Kimoto M, et al. High fidelity, efficiency and functionalization of Ds–Px unnatural base pairs in PCR amplification for a genetic alphabet expansion system. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1220–1230
- 38 Hoshika S, Leal N A, Kim M J, et al. Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science*, 2019, 363: 884–887
- 39 Fischer E C, Hashimoto K, Zhang Y, et al. New codons for efficient production of unnatural proteins in a semisynthetic organism. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 570–576
- 40 Mehta A P, Li H, Reed S A, et al. Replacement of 2'-deoxycytidine by 2'-deoxycytidine analogues in the *E. coli* genome. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 14230–14233
- 41 Mehta A P, Li H, Reed S A, et al. Replacement of thymidine by a modified base in the *Escherichia coli* genome. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 7272–7275
- 42 Marlière P, Patrouix J, Döring V, et al. Chemical evolution of a bacterium's genome. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 7109–7114
- 43 Pezo V, Liu F W, Abramov M, et al. Binary genetic cassettes for selecting XNA-templated DNA synthesis *in vivo*. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 8139–8143
- 44 Luo M, Groaz E, Froeyen M, et al. Invading *Escherichia coli* genetics with a xenobiotic nucleic acid carrying an acyclic phosphonate backbone (ZNA). *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 10844–10851
- 45 Liu C, Cozens C, Jaziri F, et al. Phosphonomethyl oligonucleotides as backbone-modified artificial genetic polymers. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 6690–6699
- 46 Inoue N, Shionoya A, Minakawa N, et al. Amplification of 4'-thioDNA in the presence of 4'-thio-dTTP and 4'-thio-dCTP, and 4'-thioDNA-directed transcription *in vitro* and in mammalian cells. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 15424–15425
- 47 Maruyama H, Furukawa K, Kamiya H, et al. Transcription of 4'-thioDNA templates to natural RNA *in vitro* and in mammalian cells. *Chem Commun*, 2015, 51: 7887–7890

Summary for “以非天然核酸为遗传物质的人工生命构建”

Construction of synthetic life forms with genetic materials comprising unnatural nucleic acids

Yanfen Bai, Peng Nie, Chenghe Xiong, Junlin Wen, Haiyun Gan, Qing Ma, Zheng Hu, Xuefei Li, Tao Yu, Jiandong Huang* & Hui Mei*

Shenzhen Key Laboratory of Synthetic Genomics, Guangdong Provincial Key Laboratory of Synthetic Genomics, CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shenzhen 518055, China

* Corresponding authors, E-mail: jd.huang@siat.ac.cn; hui.mei@siat.ac.cn

One goal in synthetic and engineering biology is to create alternative life forms with novel functions through the design and construction of new biological components and systems. Three main approaches are used to achieve this goal: (1) Constructing a regulatory network through natural biological module assembly; (2) building artificial genome DNA via *de novo* DNA synthesis; and (3) creating artificial biological systems or living organisms based on synthetic materials (such as chemically modified nucleic acids, proteins or lipids). In the third research area, also referred to as “chemical synthetic biology”, scientists investigate alternative genetic systems, other than DNA, with the aim of building synthetic life forms.

A variety of chemically modified nucleic acids, also known as xenobiotic-nucleic acids (XNAs), have been designed and synthesized over the past few decades. They can be classified with respect to the modification sites, including nucleobase-modified XNAs, sugar-modified XNAs, phosphodiester-modified XNAs, or nucleic acids containing two or three combinations. Compared with natural DNA/RNA, XNAs possess similar but superior chemical and biological properties, which enable them to function more effectively for biomedical, biotechnology and nanotechnology applications. More importantly, chemical synthetic biologists gain more insight into the chemical etiology of ribofuranosyl nucleic acids DNA/RNA, and the chemical basis for genetic functions including information storage, heredity and evolution. With the help of laboratory-evolved XNA polymerases, genetic information encoded in XNAs could be transferred back and forth into DNA, suggesting certain XNAs can function as alternative genetic material *in vitro*.

It is not yet known whether these XNAs can replace DNA and function as genetic material in living cells. In nature many variations of nucleobase, sugar and phosphate backbones of DNA and RNA have been observed, demonstrating that integrating alternative genetic sets into living systems is possible. Nevertheless, the structural diversification of XNAs and the complexity of the cell environment make it challenging to insert XNAs into living cells. Initial studies showed that genetic information encoded by the XNAs inside a plasmid can be accurately used to generate DNA copies. Through the insertion of unnatural base pairs (UBPs), semi-synthetic organisms with extended genomes were successfully constructed. All these results highlight the possibility of using alternative XNAs for artificial life. Furthermore, the construction of synthetic life forms will increase our understanding of the fundamental principles of living systems, the origins of life and evolution.

synthetic biology, unnatural nucleic acids, genetic materials, synthetic life, new life forms

doi: [10.1360/TB-2020-0474](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0474)