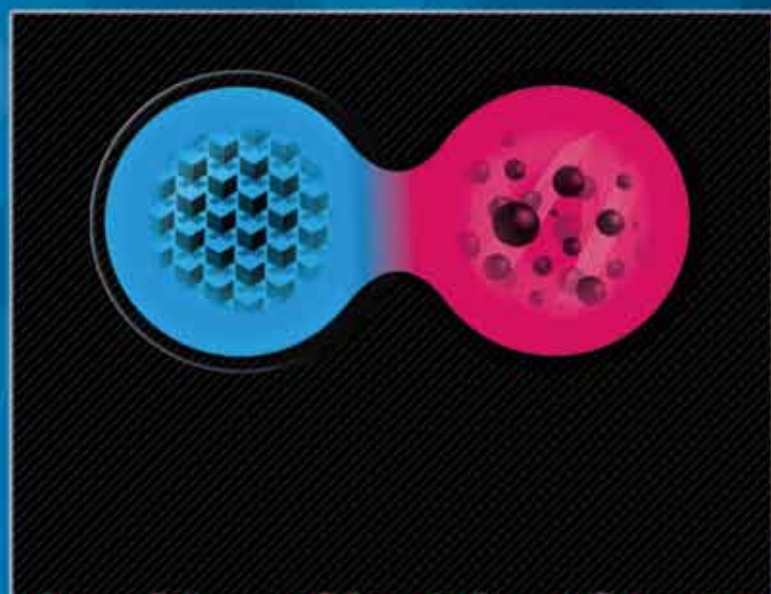


生命奥秘

LifeOmics

2014年 10月刊 总第69期



合成生物学的发展现状 及未来展望

不再混沌

海藻能为喉盘鱼节省吸力

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

目录 CONTENTS

专题

合成生物学的发展现状及未来展望

前言	01
一、合成生物学简史	02
1. 1961-1999: 合成生物学的起源	03
2. 2000-2003: 基础发展年代	04
3. 2004-2007: 快速发展时期及成长中的“痛”	06
4. 2008-2013年: 发展速度和规模不断加快	08
5. 未来的展望	14
二、给生物操作系统编程: 基因组的设计、组装与激活	17
1. 基因组重写	17
2. 基因组组装	18
3. 将完整基因组植入酵母	19
4. 基因组激活	22
5. 基因组移植	22
6. 非细胞基因组的激活	23
7. 基因组设计	24
8. 结语	25
三、用合成生物学方法研究自然发生论	27
四、合成生物学的两大主流方法	32
1. 理性设计	33
2. 定向进化	33
五、关于合成生物学的精彩观点集萃	36

下一期(2014年11月刊)预告: 精神分裂症

目前大约每100个人中就有1人忍受着精神错乱、神志不清以及社会退缩(不合群)等精神分裂症症状。尽管至今研究人员还没有开发出有效的治疗策略,但他们已在基因及生化水平上了解了更多这种严重精神疾病的成因。下一期《生命奥秘》将以“精神分裂症”为专题,从精神分裂症的病因、治疗、预后、预防等方面深入剖析这一疾病,以期让更多人了解这种疾病,关注这种疾病。

热点

不再混沌	43
------------	----

百态

海藻能为喉盘鱼节省吸力	48
白蚁通过感知超短时差的抵足震动来获得警报	50

本刊文章主要由国外网站文章编译而成,如有版权问题,请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章,版权归作者本人和本刊所有,如需转载,请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据,仅供科研参考。



专题

Worthy Issues

合成生物学的发展现状及未来展望

前言

自2000年起步至今，短短十多年，合成生物学就已经获得了相当大的发展，已然成为一门旨在将工程原理应用于复杂生物系统的、充满活力的研究学科。本期专题深入分析了合成生物学的发展历程、发展现状、发展潜力及其面临的挑战，以期起到抛砖引玉的作用。



一、合成生物学简史

2000年前后，合成生物学的出现是建立在人们具有变革性的论断之上的——借助工程学方法，可以对细胞系统进行透彻的研究，并能帮助人们更好地对有机体进行操作，产生引人瞩目的成果。当时绝大部分细胞和分子生物学方面的遗传工程操作对人们来说还十分陌生。十几年过去了，合成生物学在研究范畴、未来潜力及产品转化方面都有了长足的发展，并已经作为生物研究的一个分支被广泛认可。在合成生物学发展的第一个十年内，在很多方面进展都是跳跃式的，当我们面对活细胞内更加复杂的、我们没有预知的情况时，往往会推翻既有的技术或原则，用崭新的方法进行研究。

尽管大家对合成生物学的准确定义还没有达成共识，但是，人们普遍接受一个更广义的界定：使用分子生物学的工具与技术对细胞性质与功能进行遗传工程修饰。随之出现的是一系列常用的工程学方法以及该领域生机勃勃的文化氛围。大部分合成生物学的基础工作都是在微生物模型大肠杆菌（*Escherichia coli*）及酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）内进行的，这些微生物体系到现在也仍然是该领域重要的模型，有着十分广泛的应用，例如复杂遗传通路设计、代谢工程学、最简化基因组的构建以及以细胞为基础的治疗策略的发展等。

时间轴 | 合成生物学简史

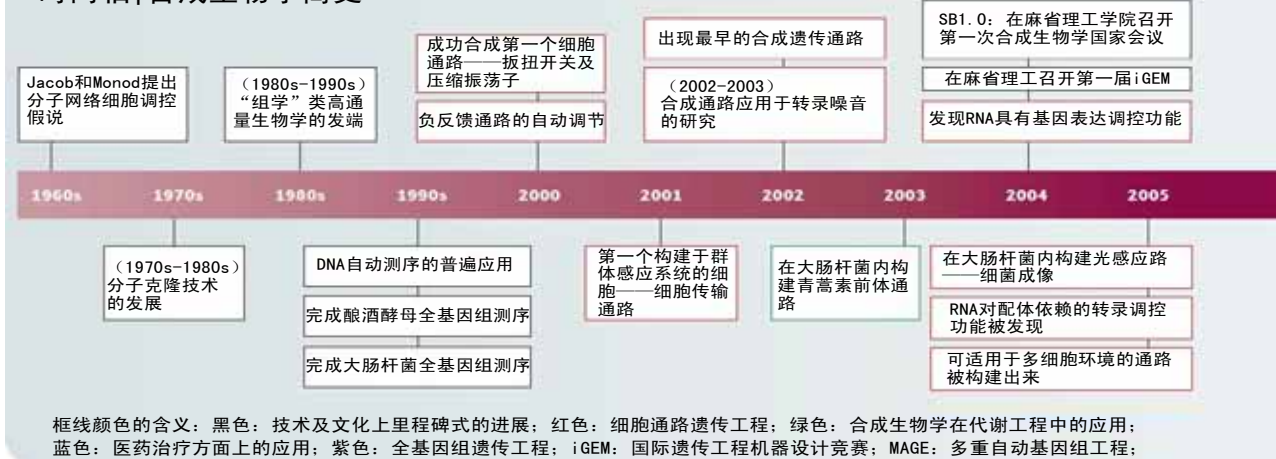




图1 时间轴|合成生物学简史。

1. 1961-1999：合成生物学的起源

合成生物学的起源可以追溯到1961年 Francois Jacob和Jacques Monod发表的具有标志性的文章。他们对大肠杆菌内的乳糖操纵子进行研究，认为在细胞内存在着对环境改变做出反应的调控通路。由此，人们立刻想到是否可以将分子组分进行组装形成新的调控系统。然而，这一想法一直没能实现，直到在接下来的若干年里，人们在分子水平对细菌内的转录调控有了足够的认识，建立于程序化基因表达的更加具体的图景才开始逐渐成形。

在20世纪的70年代和80年代，相继出现了分子克隆和PCR技术，在微生物学研究中的基因操纵变得日益广泛，这些为人工基因调控提供了最初的技术可能。但是，在那个前基因组时代，基因工程方面的研究方法基本局限于克隆和重组基因表达。简而言之，在那个时候，遗传工程还没有与之相配套的必要知识基

础与工具，用于人为构建生物系统，对微生物有机体的多样性及深层次的调控机能进行研究。

在上世纪90年代中期，自动DNA测序及日益升级的计算机工具使得人们可以对微生物的全基因组进行测序了，此外，测定RNA、蛋白质、脂类物质和代谢产物的高通量技术的出现，帮助科学家构建了一大批细胞元件，从而对它们之间的相互作用进行研究。这些分子生物学方面的成果的增长催生了系统生物学的产生，生物学家与计算机科学家也开始将实验与计算机结合起来，从事遗传工程方面细胞功能通路的研究。经过旷日持久的努力，那些持续不断的基础研究逐渐让研究者们明白，尽管细胞内的各种生物通路如此庞大而又错综复杂，但是我们还是能将其划分成不同的功能模块，这一点与许多工程学系统都是类似的。

逐渐地，人们认识到，对生物系统的科学操控，既可以通过系统的逐渐转化，也可以将其分子模块重组，这就是生物工程的基础。作为自上而下的系统生物学方法的补充，是自下而上的方法将不计其数的分子元件用于构建细胞的调节通路。这一方法既可以用于研究自然

系统的功能组成，也可以用来构建人工调节网络，最终应用于生物技术及医药健康领域。在20世纪90年代末，开始有一小部分工程师、物理学家及计算机科学家认识到生物学领域所蕴含的巨大前景，纷纷开始转向与分子生物学相关的研究。

2. 2000-2003：基础发展年代

早期合成生物学家获得了一个发展契机，那就是具有相应功能的简单基因调控通路的构建，其运行方式与电路相似。这些简单的基因通路的动态作用可以采用简单的数学模型来描述，以便通路工程师对以模型为基础的设计方法的优劣进行评估。分子生物学的经典模型——大肠杆菌是该研究的理想平台，因为我们对其生物学性质已经有了较为深入的了解，而且对它的基因操控也较为简单，此外，还与它相对而言研究得已经较为透彻的基因调控系统有关，我们可以较轻松地获得那些通路中的元件。

2000年1月，陆续有研究者发表了关于携带人为设计功能的遗传通路成功构建的研究成果。比如，Collins等人构建了一个含有启动子的扳钮开关，可以驱动具有相互抑制作用的转录抑制因子（图2a）。含有这一通路的细胞可以根据外界信号，做出不同的反应，在两种稳定表达状态之间实现转换。在另一项研究中，Elowitz和Leibler构建了一个含有循序抑制因子-启动子三重负反馈循环的摆动通路（图2b）。激活此通路，可诱导抑制蛋白的周期性有序表达。

上述两项研究的基础思路是相似的，都构建于一系列类似的元件（例如，可诱导的启动子系统）；都采用GFP的表达作为监测细胞通路功能的输出信号；都采用了以模型为基础的设计。但是想要模型与实验结果之间达成一致，需要不断地将组件进行更换，以达到预想中的功能。这些研究奠定了生物工程中的基本

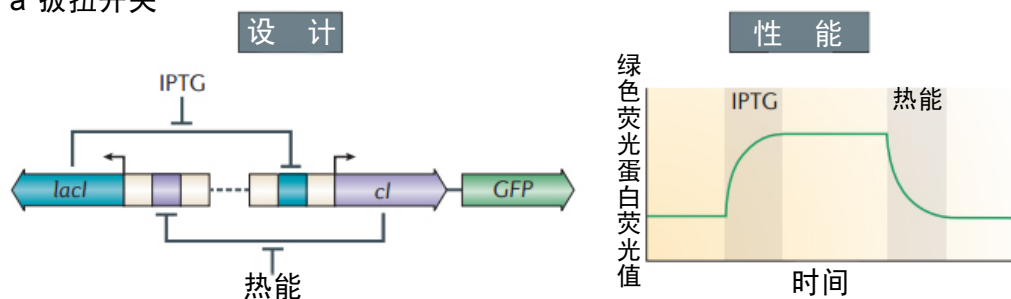
流程，包括定量设计、物理构建、实验测量及假说驱动的调整等，这些到现在仍然是合成生物学中构建细胞通路的典型方法。

在上述两项研究发表后不久，开始有研究者采用细胞通路遗传工程对通路设计与表达产物数量之间的关系进行研究。在那个时期，主要对简单的能够自我调控的负反馈和正反馈模块（图2c）进行研究，并且采用与上述含有三重负反馈循环的摆动通路不同的模式，构建了新的、个性更加稳定的基因摆动通路。Leibler等人用一组转录调节子将具有各种不同逻辑门特性的遗传通路组合在了一起。

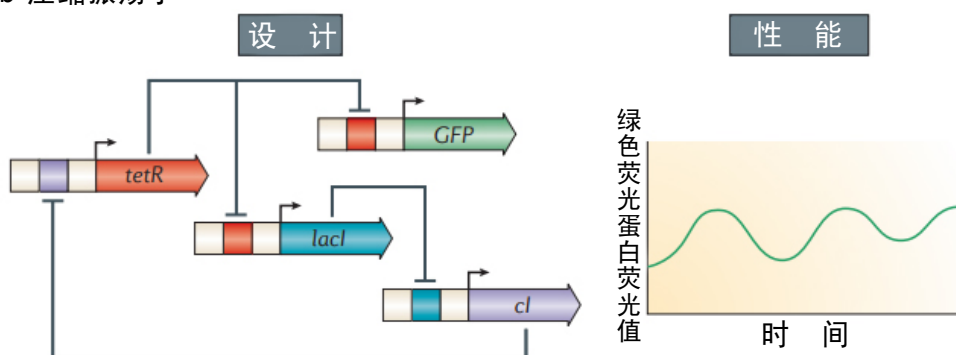
Weiss等人建立了以构建转录为基础的逻辑门的生物工程方法，并对采用遗传工程研究细胞通路方面的语言及实验方法进行了规范。从简单的细胞通路研究中，我们可以探知原核及真核细胞内基因表达与分子“噪音”之间的关系，这让我们开始看到合成生物学在未来研究中的潜力——它可以帮助我们阐明和扩展对基础生物学的认知。

尽管主要的研究都集中于细胞通路的遗传工程方面，但是早期的研究者已经开始将研究的范围扩展到了简单基因调控网络之外。很快，出现了细胞——细胞通信通路，预示着在接下来的若干年，我们将朝着更广阔的方向迈进。此外，有研究者在酿酒酵母（*S.cerevisiae*）中采用蛋白质-蛋白质相互作用结构域及支架蛋白对翻译后调控进行了研究。

a 扳扭开关



b 压缩振荡子



c 自动调节回路

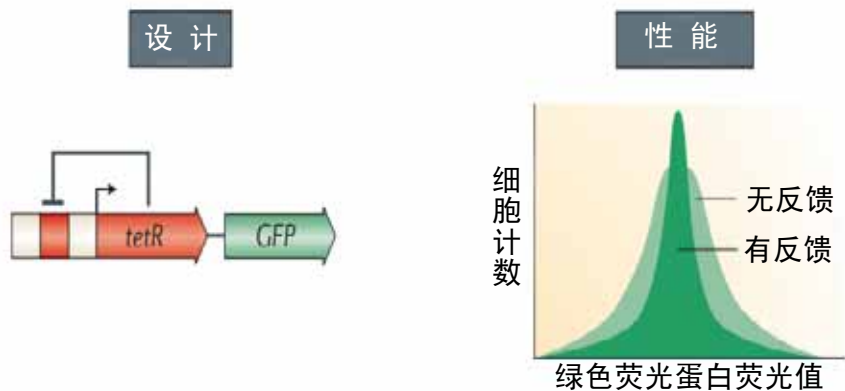


图2 合成生物学发展初始年代一些关于基因通路的研究成果的例子（2000-2003）。a. 扳扭开关。一对抑制基因（*lacI*和*cl*）可以互相抑制对方的转录，从而形成一个双相稳定遗传通路，在任意一个时刻，两个基因中只有一个会被激活。可以通过调节环境输入信号，来控制开关达到其中一个进入转录状态，这一过程是通过将其中一个抑制因子解离来实现的（例如，异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）可以用来解离LacI，热能可以用来解离cl）。一旦这种环境信号消失，所需要的转录状态可以一直持续若干代。b. 压缩振荡子。这一通路包括三个抑制因子——启动子相互作用关系（在*cl*，*LacI*及*TetR*抑制子之间）彼此相连形成环状网路。其中，*TetR*对GFP报告节点进行调控。使用延时拍摄荧光显微镜进行单细胞分析研究时，此通路的GFP表达呈现周期性抑制——启动模式，可以延续数代。c. 自动调节通路。在此通路中，*TetR*介导的自身负反馈调节系统使该基因只在特定组织内表达，这一结果是由共转录GFP报告基因测量获得的。该通路证实了一个一直以来在工程学控制系统及非线性动力学领域人们所共识的规则——可通过引入负反馈降低噪音。

3. 2004-2007：快速发展时期及成长中的“痛”

从本世纪第一个十年的中期开始，合成生物学的规模与范围开始快速增长。2004年夏天，在麻省理工学院（MIT）召开了该领域第一个国际性会议“合成生物学1.0”（Synthetic Biology 1.0, SB1.0）。会议将来自生物、化学、物理、工程及计算机科学领域的研究者们聚集在了一起，因对这一新兴领域产生的正面力量而备受好评。会议的召开意味着为合成生物学创建了一个“身份”，激励着相关研究人员在生物系统的设计、构建及性质研究方面进一步努力，为全基因组工程的长期目标打下基础。由于合成生物学涉及多种学科的交叉，当代工程学的理念首次开始渗透到分子生物学研究中，同时也提出了两个领域是否具有兼容性的问题。合成生物学是否会发展成工程学的一个主要分支，与电子工程、机械工程等平起平坐？在工程学中常用的零件标准化以及抽象层级的概念是否能运用到生物系统中？研究人员首次开始真正想要努力提高遗传工程的研究层次，主要通过构建一系列模块元件及不断开发构建和调控特定通路设计的方法。

重要突破。这一时期，运用大肠杆菌进行

元件及通路设计研究不断取得里程碑式的进展，以RNA为基础系统的研究将合成通路设计从一直以来的转录调控扩展到了转录后及翻译调控范畴（图3a）。新的元件与通路设计不断涌现，例如构建于某个基因转录的AND逻辑门，只有该基因转录与某个经遗传修饰的tRNA转录都发生时，才能启动翻译过程（图3b）。群体感应通路（Quorum-sensing circuitry）则更进一步，可以对多细胞进行控制，并安置了一个光感通路，用光照启动基因表达（图3c）。

也许这一时期最引人瞩目的科学进展发生在代谢工程学领域，合成生物学的正向工程原理与长达数十年对异戊二烯类物质生物合成的基础研究结合在一起，生成了青蒿素的前体物质。青蒿素是一种应用广泛的抗疟药，它是由自然界的艾草（*Artemisia annua*）生产而成的。另一方面，在复杂聚酮及非核糖体肽类物质的科学设计方面也取得了非凡的进展。这些成果都让人们看到了合成生物学转化成巨大商业价值的潜力。利用合成通路促进细菌进攻肿瘤细胞，是早期为提高人类健康水平，尝试以细胞为基础的治疗手段之一。



令人望而生畏的障碍。当研究者希望能够将新的元件组合在一起，建立更加复杂的通路时，他们很快意识到会遇到很多阻碍。第一，将遗传元件组合成复杂的通路的有效方法还没有建立，这意味着需要花费很长时间来组装那些绝大部分都是新的通路的设计元件。第二，由于缺少对遗传元件功能的检测方法，事情往往事倍功半，需花费大量时间与精力对构建的通路进行调整和重新设计，才能保证其具有正确的功能。第三，由于在设计构建过程中，优化调整的过程采取随机的方式，因此功能通路中往往包括性质未知的组件，当需要在新的通路中使用这些组件时，就不得不耗费时间去对其功能进行了解。

在那时，人们建立了公共的资源库——标准生物元件中心（**Registry of Standard Biological Parts, RSBP**），用计算机对基因组件进行分类，并将其按照标准的“生物积木”（**biobrick**）形式进行储存，方便研究者有序地将各组件组装成为更大型的通路。尽管接下来很快出现了如**Golden Gate**、**Gibson Assembly**等的一步组装方法，限制了**BioBrick**组装在国际基因工程机器大赛（**International Genetically Engineered Machine, iGEM**，是一项大学生合成生物学竞赛）中的应用，但是，**RSBP**及其在册元件仍然被证明是更广泛学界内重要的基因序列数据库。将这些登记的元件翻译成计算机语言——合成生物学开放语言（**Synthetic Biology Open Language, SBOL**）可以使软件工具具备描述合成元件及通路设计的标

准格式，便于之间的转换。研究方法大全（**OpenWetWare**）是一个发端于MIT的公众维基百科，已经发展成为合成生物学领域非常有价值的开放资源，作为研究者共享实验操作流程的论坛，其承载着实验室主机运行。

对生物元件的特性进行研究和描述是一个更加大的困难。在多数情况下，即使已经了解得十分透彻的元件，当离开其原本的特定环境时，还是不能发挥其预想的功能，而把它们与其它元件结合在一起形成某个通路时，则更是经常不能保持原有功能。对于这类元件间的相互影响，以及元件对环境的依赖所产生的问题，一时难以解决，从而也就阻碍了更复杂通路的研究进展。因此，合成生物学家一直使用着相对简单的通路设计。

在2005年前后，合成生物学开始同时赢得科学及大众媒体的目光，这其中，**iGEM**扮演了很重要的角色，它在大学校园内为合成生物学积累了相当的人气，同时也引起了公众的兴趣。科研赞助机构也纷纷顺应潮流，尤其是美国国家科学基金会（**National Science Foundation**）。该基金会为合成生物学工程研究项目（**Synthetic Biology Engineering Research Project, SynBERC**）提供了大量资金支持。**SynBERC**是一个由来自美国多家一流科研机构的合成生物学实验室所组成的联盟。此外，随着**SB3.0**在瑞士苏黎世、**SB4.0**在中国香港的召开，合成生物学在那些年也变得越来国际化，这些都使合成生物学的学界地位得以巩固。

4. 2008–2013年：发展速度和规模不断加快

与之前缓慢的发展速度不同，到了这个阶段，合成生物学领域已经逐渐成熟，不论是发展速度还是质量，都有了质的突破。从2008年开始，有关合成生物学研究工作的文

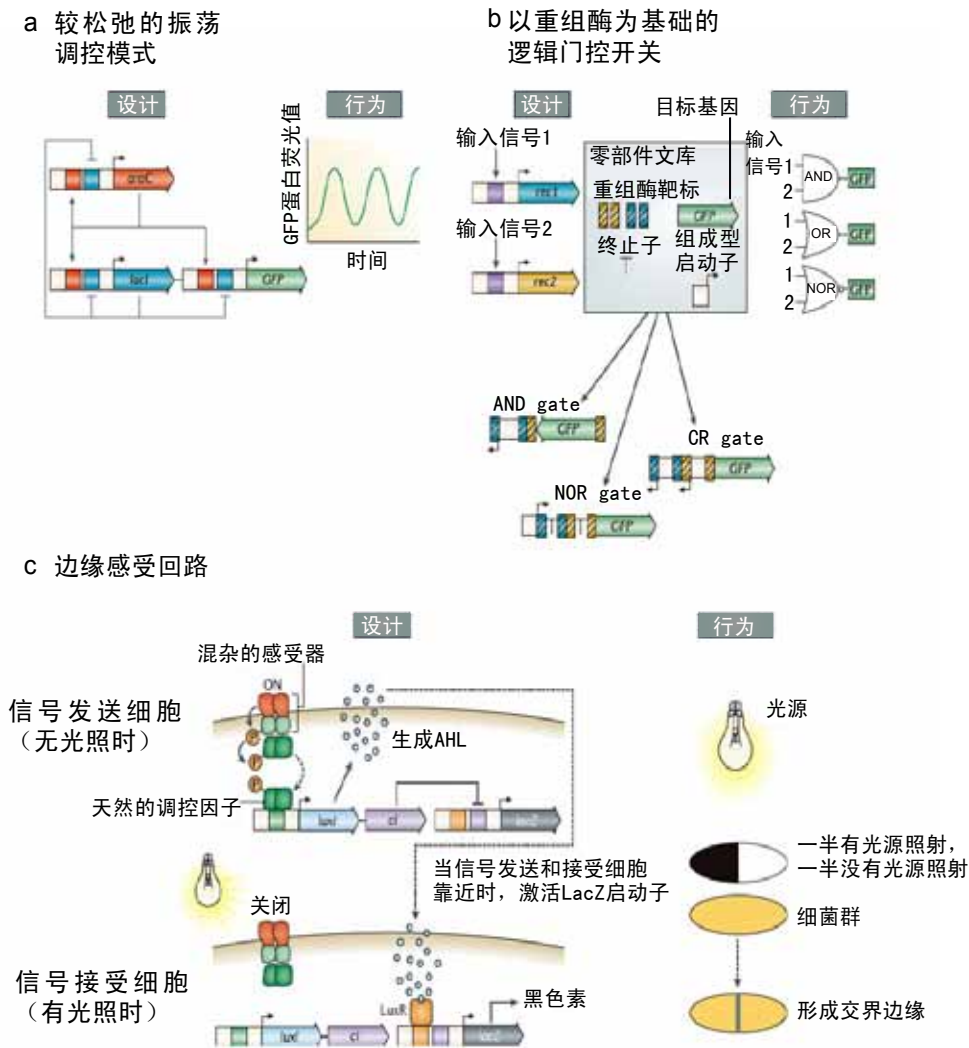
章中报道的人工系统变得越来越复杂，用于合成工作的“零部件”的质量越来越好，种类也越来越多，它们能够行使更加精确、更多样化的功能。虽然各组件对周围环境的依

赖性（context-dependence）以及互动能力（interoperability）方面仍然是合成生物学工作中的难点，但是经过不断的努力，也取得了一定的进展，使各方面更加平衡，增强了生产效率。实际上，很多从一开始就进入合成生物学研究领域的科研团队从21世纪中期就已经开始改进工艺，使用更先进的技术开展工作，理解、设计，并构建更好的合成生物系统。高通量DNA组装（High-throughput DNA-assembly methods）技术，以及不断降低的基因合成费用更是加快了合成工作的速度和效率。

Hasty等人在2008年开发出了一套功能强大、能够持续行使振荡行为（oscillatory behaviour）的人工合成生物系统，这是有史以来科研人员们设计并试验过的一系列振荡系统中给人印象最为深刻的一套改进系统（图4a）。Hasty等人将定量模型（quantitative modelling）与强大的人工生物系统合成设计理念相结合，整套系统的运作以微流体平台（microfluidics platform）为特点。接下来，又将群体感应（quorum sensing）技术加入其中，从而实现了对整个群体内的人工合成系统同步化（population-wide synchronization）的功能。气相氧化还原反应信号系统（gas-phase redox signalling

system）的加入更是让这套振荡系统的作用扩展到厘米级的水平（centimetre-length scales）。

2009年，出现了两套重要的基因回路系统，这也是合成生物学家们期盼依旧的一大目标。其中之一利用的就是重组酶介导的DNA重排技术（recombinase-mediated DNA rearrangement），科学家们用这种方式构建了一个对某个特定生物事件的永久性记忆（permanent memory），后来又用这套策略构建了一整套基于重组酶的逻辑门（recombinase-based logic gate）（图4b）。在大肠杆菌里实现了功能强大的转录逻辑门（transcriptional logic）的全人工化合成工作，包含16个逻辑门元件，以及一套利用了多重转录级联系统（multitier transcriptional cascade）构建的、包含多个输入信号的逻辑系统（multiple input logic network）。在该阶段还取得了另外一个非常重要的成果，即将细菌的感光系统（light-sensing circuitry）拓展到了遗传边缘检测系统（genetic edge-detection circuit）（图4c）。以及利用依赖群体感应能力的鞭毛运动功能的人工系统在大肠杆菌里成功地构建出了群体模式（population-wide pattern）。



注：AND：逻辑与；OR：逻辑或；NOT：逻辑非；gate：逻辑门控开关

图4 2008至2013年间已报道的合成生物学成果展示。a，松弛的振荡调控结构。该回路由AraC和LacI等已经被广泛认可和使用的元件构成，但是该系统的设计理念与图2b中展示的环形抑制系统完全不同。在这套系统中采用了一种正反馈和负反馈重叠的方式，其中AraC和LacI分别调控正反馈和负反馈途径。各组件以非常精细的模型为基础组合起来，并且经微流体设备分析，以确保能够对微环境进行精细的调控。所有这些科技进步最终凝结成了这套强大、稳定，可以在好几代细菌中进行群体振荡调控的系统。b，以重组酶为基础的逻辑门控开关系统。这些系统利用了重组酶为基础的DNA倒位和许多生物学基本组件。使用少量已经被充分验证过的组件就可以构建出所有16种逻辑门控开关。这套系统的输入模块可以保持不变，用小分子来诱导Rec1和Rec2这两种重组酶。这些重组酶可以使它们的靶序列单向倒位（unidirectional inversion）。根据这些遗传部件在整个未诱导回路里的顺序和方向，小分子输入信号就能够在各种逻辑门控开关的控制下诱导出GFP输出信号。比如逻辑与门控开关就只有在两种输入信号都存在的情况下才能让组成型启动子和GFP编码基因各自倒位，构成合适的顺序，输出GFP信号。c，边缘检测回路。群体感应系统结合双元件光感受器计算图中所示区域的边缘。在这套系统里，未被光源照射的细菌是信号发送细胞，能够产生并分泌群体感应分子AHL，受光源照射的细菌是信号接受细胞，不能产生AHL，但是能够对AHL起反应，并表达LacZ酶，合成黑色素。信号接受细胞感受附近未被光照的细菌发出的AHL信号，表达黑色素，从而形成图中可见的一条界线。

名词解释

抽象系统 (Abstraction hierarchies)

这是一种用于简化设计流程的组织方案。根据各个模块的特点分别对其进行介绍，会构建出非常复杂的系统。在合成生物学领域，被命名为“部件 (parts, 这也是整个系统中层级最低的层面)”的分子元件可以构建出“设备 (devices, 由多个部件组装而成的、具有一定功能的组合体)”，这些设备又可以进一步组装出“系统 (systems)”。

流量平衡分析 (Flux-balance analysis)

这是一套数学运算技术，可以模拟活体生物系统内部稳定的代谢状态。

正向工程学 (Forward-engineer)

从对某一个特定功能的抽象描述开始，一步步实现对这个目标的工作策略。在合成生物学领域，这是构建具备某种特定行为生物系统的工作流程。

逻辑门 (Logic gate)

这是一套能够行使布尔逻辑运算 (Boolean logic operation) 的设备或系统，能够对一系列数字输入信号进行运算，最终输出数字运算结果。比如只有在某个特定环境信号的刺激下才会激活基因表达的人工遗传学回路 (genetic circuit) 就可以构成一个“逻辑与 (AND)”逻辑门。

零部件标准化 (Parts standardization)

在工程学领域，零部件标准化指的就是其特性与连接模式已经被清楚定义，能够被广泛使用的构建模块。

反向工程学 (Reverse-engineer)

对一套系统的组成元件进行检测，以了解这些部件组合之后的整体功能的一种策略。在系统生物学 (systems biology) 领域，该工作包含对细胞网络进行干扰，构建模型，描述分子元件的行为与整个系统之间的关系。

系统生物学 (Systems biology)

试图开发、检验活体系统整体模型 (holistic models) 的一个交叉学科。在“自上而下”的策略下，使用定量模型来发现并描述生物合成学的原理，以及整个系统的调控网络机制，同时使用“自下而上”的策略作为补充，对各个组件之间因为相互作用而表现出的、整个系统的表型进行建模。

由于生物感应功能（**biosensing functions**）给以RNA为基础的运算（**RNA based computation**）提供了方便，所以以RNA为基础的生物合成工作在这个时期也得到了进一步的扩展。各种各样的RNA设备被开发出来，用于控制对基因表达的逻辑调控工作。同时也开发出了多种RNA设计工具，以便对异源的（**heterologous**）和内源的（**endogenous**）基因靶标进行精确、可预测的控制。细菌和古细菌内的CRISPR-Cas免疫系统也被赋予了新的目的，实现了全基因组转录控制。2型CRISPR-Cas系统使用RNA引导的DNA结合功能以及Cas9核酸酶，对外源的噬菌体和其它水平转移DNA进行识别与切割，各个课题组也各自独立开发出了各种Cas9核酸酶突变体，比如能够识别DNA但是不会对其进行切割的Cas9核酸酶。Cas9核酸酶的DNA结合特异性是由一段RNA靶标识别序列决定的，该序列让Cas9核酸酶几乎能够识别任何基因组序列或附加体（**episomal**）序列。如果给Cas9核酸酶添加一个转录激活因子或者转录抑制因子，该系统还可以对特定的基因或操纵子（**operon**）进行转录调控。

在这个阶段也出现了翻译后控制系统。人工合成的蛋白质骨架开始被用到最新的人工反馈回路当中，以便对酵母细胞中天然的有丝分裂原活化蛋白激酶信号通路（**mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway**）的动态行为进行可预测的调控。在多个独立进行的大肠杆菌实验中，这些人工合成的骨架也被用来对由两个组份构成的信号通路进行重建（**reroute**），在另外一个研究工作中，用于共定位与甲羟戊酸（**mevalonate**）生物合成通路相关的酶，提高葡萄糖酸（**glucaric acid**）的产量，减少有毒中间代谢产物的生成。Chau等人使用蛋白信号通路人工回路在酵母细胞内形成了一个极化的空间（**spatial polarization**）。该人工回路是对与局部分布相关的自我组织组件进行改造而成的。该研究让我们向对细胞形状及运动这样复杂的表型研

究进行控制迈进了一大步。在较短的时间内，这种人工系统可以被用来对生物合成通路中的组份进行共定位，或者隔离操作。翻译后人工回路设计工作目前还处在概念验证阶段，还需要功能强大的平台以确保翻译后控制能够精确地锁定蛋白质靶标。

在此期间，合成生物学家们也开始使用网络化工程技术（**network engineering techniques**）来解决一些基础问题，比如自然网络的形成、功能或进化可塑性等方面的问题。很多研究都使用了特定的、综合的细胞扰动控制技术，来解析自然条款网络的设计原理。其中有一项著名的研究，是针对天然的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）用来功能竞争的回路进行的，将其与综合的再连接版本进行了比对。虽然这两套系统的动态性是相似的，但是随机扰动上的差异还是导致这两套系统分化成了两种不同的功能状态。在另外一项研究里，科研人员们对大肠杆菌的转录条款系统进行了系统的人工改造，结果发现新加入的网络联系只额外增加了很少的适应成本，但是在某些情况下，却可以带来适应方面的获益。

应用。在此阶段，随着系统生物学及合成生物学的不断发展，其成果不断地与已有的工作相融合，代谢工程学（**metabolic engineering**）也取得了飞速的发展。由于基因组数据的爆炸式增长，以及DNA合成成本的不断降低，也给代谢工程学带来了便利，在开发合成通路预测模型，用以寻找最合适的代谢通路时，不仅可以借助宿主本身的代谢系统，还可以利用所有已知的、或者预测出的酶功能。生物工程师们随后可以利用正向工程学策略，利用各种通过基因组发掘工作发现的酶来填补宿主代谢系统里的空缺，从而构建出代谢通路模型。最近使用这种策略对大肠杆菌进行了一系列成功的改造，比如重建了氨基酸生物合成通路，生成了以异丁醇（**isobutanol**）、脂肪酸为基础的生物燃料和汽油，以及具备生物可塑性的1, 4丁二醇

等。

还有科学家利用系统调控策略来设计新的菌（物）种，比如使其能够对代谢通路进行动态控制，以对关键的代谢中间产物或环境影响因素做出反应。其中就包括使用人工开关和群体感应系统，使群体数量和乙醇产量相适应；以及创造出脂肪酸感应回路（来反向调控乙醇生物合成通路）和浓缩通路，获得高质量的生物燃料，而不至于积累过量的乙醇。

2013年初，合成生物学在应用方面迈出了里程碑式的一步，开始应用于抗疟药青蒿素（artemisinin）的大规模工业化生产。比尔和梅林达盖茨基金会（Bill and Melinda Gates Foundation）通过OneWorld Health项目和PATH（Program for Appropriate Technology in Health）项目给Amyris公司提供了资助，帮助他们人工设计了一条青蒿酸（artemisinic acid）合成通路，通过该通路在酵母细胞里就能够生物合成青蒿酸。Amyris公司将该技术无偿提供给了赛诺菲制药公司（Sanofi）。作为回报，赛诺菲制药公司同意以成本价向发展中国家的疟疾患者提供该药品，因此在未来，将由大量疟疾患者会因此而挽回他们的生命。

同一时间，合成生物学在其它方面的应用也日渐成熟，比如人工噬菌体疗法（phage-based therapies）以及其它一些细胞治疗策略：可以发现并杀死铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）的大肠杆菌益生菌（probiotic *E.coli*），或者能够表达异源群体感应信号，抑制霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）毒力的大肠杆菌益生菌。科学家们也正在探讨合成生物学对健康的影响和安全性等问题，参见《2010生物伦理主席委员会合成生物学报告》（2010 Presidential Bioethics Commission report on synthetic biology），这些工作有助于我们开发出相应的安全防卫技术，比如防止人工微生物泄露到自然界中去的可控的微生物杀灭开关等。

全基因组设计（Whole-genome

engineering）。在这个阶段，有一些科技进展有助于我们实现对细胞的整体功能进行全面的调控，比如在SB1.0会议上就展示过有关的技术。Venter等人借助突破性的DNA组装技术创造出了一个活生生的、完全受人工化学合成基因组控制的细菌。人工合成的DNA组件通过体内重组的方式在酵母细胞中组装完成，形成了一个全人工合成的蕈状支原体（*Mycoplasma mycoides*）基因组，然后将该基因组转移到受体细菌细胞内，这样就构建出了一个活的，但是只含有人工合成基因组的新细菌。Boeke等人使用相似的酵母细胞基因组合成技术，合成了两条酿酒酵母（*S.cerevisiae*）的染色体臂，他们还去除了其中所有已知的转录子和其它不稳定的元件，包括位于每个基因两侧的重塑酶识别位点。

基因组编辑（Genome editing）。为了能更有效地进行基因组操控，Church等人开发了一种叫做多重自动化基因组改造（multiplex automated genome engineering, MAGE）的技术平台。利用这套MAGE平台可以快速地对大肠杆菌的基因组进行多位点改造，包括已经开展的概念验证研究，即用TAA密码子对基因组中的所有TAG密码子进行同意替换。细菌和酵母细胞的CRISPR-Cas系统作为一种基因组编辑工具也已经被重新定义，利用该系统的RNA介导的DNA切割功能，以及细胞内的同源重组功能，可以将一段外源的DNA序列替换到细胞的基因组内。这套系统有着相当惊人的工作效率，能够创造没有标志的基因组突变，因此有望在未来的几年时间内彻底改变细菌和酵母遗传学的现状。

现存的挑战。尽管合成生物学工作在近几年里取得了飞速的发展，但是在整个发展过程中的可变性还是给未来的工作留下了一些问题和障碍。分子生物学回路设计工作从本质上来说是一项“手艺”，但到现在还没有像其它工程设计技术那样，达到可预测、可以快速重

复的境界。虽然在精细的生物生理学模型方面取得了一些成果，比如被广泛应用的核糖体结合位点（ribosome binding site, RBS）效用计算工具，可以预测出靶基因的翻译速率，但是大家也开始慢慢接受，在复杂的细胞内环境中，可变性是无法避免的。

随着科学家们不断地尝试对生物的易变性进行各种控制和管理，逐渐出现了一种通用的方案，藉此构建大型的部件文库，可对可量化的部分功能进行精细的量化测量。可以利用这些部件组装出各种复杂的人工回路，然后对它们进行平行检测，从中选出具备目标功能的回路来应用，或者进行更进一步的优化。BIOFAB（International Open Facility Advancing Biotechnology）组织是一个生物设计制造组织，他们花大力气构建了一个大型的细菌文库，其中包括细菌启动子、RBS序列，以及转录终点等等元件。他们在各种遗传环境下对这些元件的功能进行了检测，给每一个元件都打出了一个“可靠性评分”，以帮助大家在合成生物学设计和后续的调试工作中对

有可能出现的瑕疵进行评估。

除了这种大规模的验证手段之外，其他一些科研人员也各自开发出了一些方法，来减少遗传复杂性（genetic complexity），因为这是导致细胞易变性的最主要因素。方法之一就是针对靶基因和整个操纵子进行彻底地重编码，去除任何尚未被发现的调控元件，比如mRNA二级结构及小RNA等。这种重建的方法已经被用来对T7噬菌体进行改造，也被用于重建大肠杆菌中的产酸克雷伯菌固氮系统（*Klebsiella oxytoca* N2 fixation system），另外用一整套人工调控系统来控制相关基因。另外一种相似的策略就是去除人工合成系统的复杂性，比如陆续开发出来的CRISPR系统和核酶（ribozyme）技术被用来降解人工合成系统靶基因附近序列转录生成的mRNA，即从5' UTR开始，去除掉任何非目标基因的转录产物。这一套“绝缘”系统可以非常简便、准确地预测出人工合成回路的功能和行为，从而缩短，甚至是彻底杜绝影响到整个合成生物学工作的、冗长的、反复的调试过程。

5. 未来的展望

从十几年前合成生物学研究工作刚刚起步开始，至今已经取得了非常大的进展，也获得了很多重要的成果。合成生物学领域还会继续发展下去，加快人工生物系统的设计和测试的步伐，并不断减少像最开始那样的对传统分子克隆技术的依赖，不断提高DNA合成和高通量的DNA组装技术等。在不远的将来，人工生物回路工程学操作流程将不再受限于制造技术，而是会受限于如何分析人工回路的功能和行为，如何将数据整合到新的设计当中。随着各部件的认证工作，以及各部件间的相互协调能力的提高会不断地增加人工回路设计的复杂程度，所以增加设计的多样性，扩展设计的范围就显得至关重要。同时也需要继续开发出能够对人工设计的回路进行快速筛选的新技术和

实验手段。总体而言，合成生物学将越来越少地依赖其他工程学的原理和准则，将构建出一套属于自己的新规则。

在不断发展的合成生物学设计和控制方法中，一直都遵循着分子生物学的中心法则，在最初那几年，主要发展的都是以转录为基础的调控回路，后来才慢慢出现以RNA为基础的、转录后及翻译控制系统。翻译后控制系统目前还在起步阶段，对人工及内源蛋白质全都能够进行控制的通用控制系统尚未有报道。

随着人工合成系统规模的逐渐加大，复杂程度的逐渐增加，人工系统与细胞内源系统之间的相互作用也会变得越来越重要。合成生物学工程师们需要开发出新的方法来解决人工合成系统给细胞带来的完全不一样的、沉重的生

理负担，也许应该借鉴代谢工程学的一些经验和教训，用流量平衡分析手段来解决一些类似的问题。

设计人工合成系统的工作应该逐渐将重点放在最终的应用方面。比如在代谢工程学领域，如何让人工系统与细胞自身的系统更好地相互配合，动态控制代谢流量，就是在近期需要解决的一个问题。开发细胞疗法，如何让人工细菌与人体肠道微生物发生相互作用，治疗感染性疾病和其它慢性疾病，这也是我们面临的一大挑战。

全基因组工程学目前离我们还存在一定的距离，但是通过在多个位点上对细胞的网络进行改造，从而实现全基因组范围的人工影响还是可行的，这也会慢慢成为合成生物学领域的工作中心。CRISPR-Cas系统介导的基因组编辑技术（CRISPR-Cas-mediated genome

editing）等新技术的诞生也会让合成生物学家们从更加整体的角度开展工作，相对更容易从全基因组的层面去改造人工系统。全基因组人工合成工作的技术难点和成本问题在未来也将不再成为困难，但是关于如何构建一整套新的调控系统，构建一个新的、完整的生命体，我们还缺乏相关的生物学知识和生命运作理论作为支撑。

尽管人工系统设计和构建的技术在不断发展和壮大，但是各个课题组之间的交流还非常少，绝大多数人工系统都只在本实验室内部开发和使用。从某种程度上来说，这是因为这些人工系统还处在概念验证阶段，但是随着整个合成生物学的不断发展，复杂程度不断增加，应用领域不断拓宽，我们有必要转变目前固步自封的陈旧观念，加强合作是大势所趋。



资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com



二、给生物操作系统编程：基因组的设计、组装与激活

2010年，人们人工构建了第一个合成细胞，标志着基因组学领域的重大改变，表明了对全基因组序列进行测序的技术革新已经成为可能，甚至我们可以自己去书写（合成）这些序列。这些合成的遗传指令可以在接下来的步骤中被激活，产生具有自我复制功能，并拥有特定功能与性质的生物细胞，而这些设计最初都是由计算机来完成的（图1）。在这些研究过程中，人们构建了一系列体外及体内DNA

合成与组装的方法；但是，全基因组组装与激活方法的研究步伐并没有跟上，它们的有效性也没有得到全面认识。

现在，人们可以构建大的DNA分子了，因此，对基因组设计原理没有清晰的阐述与界定的问题也日益凸显。如果这些问题能解决，我们就可以对基因组的重写与激活进行更可控的操作。本文将重点讨论细菌基因组的设计、构建与激活领域的研究进展。

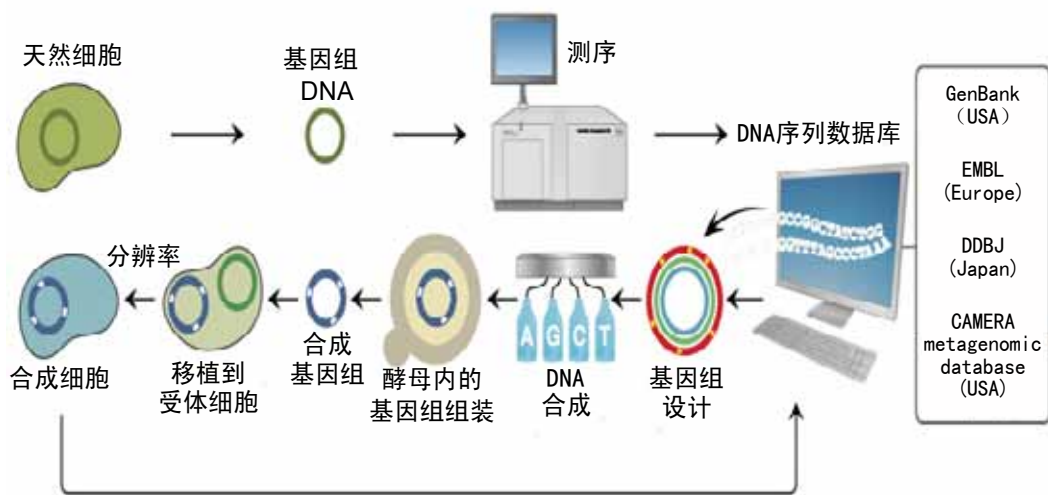


图1 生命信息与数字信息的转换。

1. 基因组重写

基因组DNA就好比是生命的软件。所有细胞的特性与功能都被写入DNA的遗传编码中。因此，生物学家可以扮演软件工程师的角色，从可以获得的基因组序列开始，对生物运行系统重编程。

目前，有一系列可用于重写基因组的方法。研究者是否能够获得自然界来源的DNA模板决定了基因组合成的范围，这也将决定应该使用何种方法进行基因组重写。如果自然界中没有所需要的序列，或者很难获得，那么就

必须采取合成方法。然而，如果基因组模版DNA很容易获得，也不需要进行大的改变，那么，完全的从头合成方法可能就不是最好的选择，毕竟它并不是最高效，或成本最低的选择。

在合成基因组过程中所需要的各个组件来自天然和（或）合成DNA，然后对这些组件进行拼装，形成基因组。图2介绍了一些基因组组装的方法。

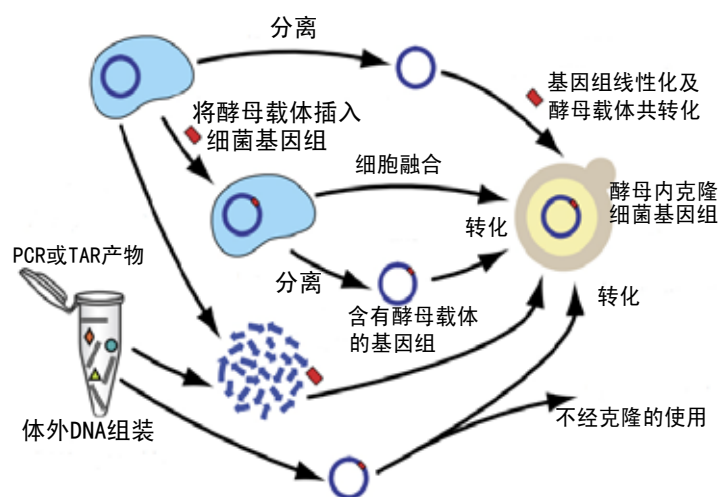


图2 基因组组装。TAR：转化相关的重组。

2. 基因组组装

2008年，人类首次发现了合成细菌基因组的纯化学合成方法。合成产物是长度为583kb的生殖道支原体基因组，DNA片段长度是在此之前所合成的最长DNA片段的将近20倍。2010年，又有研究者采用纯化学合成方法获得了长度为1.1Mb的蕈状支原体基因组，并在受体宿主内被激活，从而获得了合成细胞。上述两个基因组是实验室内化学方法合成的两个最大基因组。为了获得它们，美国克雷格·文特尔研究所（Venter Institute）的研究人员一起建立了一整套体内及体外DNA合成方法，才使得得以从最初的寡核苷酸序列最终获得整个染色体。

体外基因组组装。已有研究者报道了多个在生物体外利用酶促反应将多个互相重叠的DNA片段进行拼接形成基因组大小的分

子的方法。其中最简单的重组方法是恒温反应。参与组装的反应物混合物（通常被称为Gibson Assembly，是一种在单个恒温反应中，将多个DNA片段进行组装的方法，由Daniel Gibson在2009年发明而得名）包括一个5'核酸外切酶、一个DNA聚合酶和一个DNA连接酶。这三大酶类通力合作、实现了在短时间内、50°C环境下，将DNA片段进行无缝连接，并且不产生任何干扰性的中间产物。Gibson Assembly不需要热循环步骤将重合DNA部分结合在一起，组装过程中产生的片段由DNA连接酶催化，彼此间以共价键连接；这些特性都降低了合成DNA大分子时会产生不需要的片段的可能性。此外，连接起来的DNA组装产物与未经连接的片段相比，更容易转染至大肠杆菌中。其它体外合成方法中，同时具备“无缝连接”和不依赖原

有序列两个特点的包括环状聚合酶延伸克隆（circular polymerase extension cloning）、In-Fusion克隆技术、USER（尿嘧啶特异性切除试剂；New England BioLabs公司）及不依赖于序列及连接的克隆（sequence-and ligation-independent cloning）。这些方法在对20kb大小的DNA片段组装方面已有成熟的应用，但还没有应用于更大的DNA分子例如整个基因组组装。

体外DNA组装方法比体内组装更快速，也更容易，因此往往作为首选。但是，体外DNA组装也有局限性，因其通常不能产生足够大的样本量用于下一轮DNA组装或者其它具体应用，所以在此之前都需要警醒扩增。Gibson Assembly方法的主要优点是，产生的产物是共价键相连的片段，因此可以立即将片段用PCR及滚环扩增法（rolling-circle amplification methods）进行扩增。这和把片段转染至宿主有机体，然后依靠宿主DNA复制机制产生组装产物的方法是完全不同的。除了速度更快，操作更简单之外，体外扩增方法还能避免产物在宿主细胞内暴露于有毒物质，或者稳定性下降等问题。但是，也要指出的是，PCR和滚环扩增法和细胞内克隆相比，会更容易产生突变。此外，目前，这两种方法还不能用于扩增基因组大小的片段，并且产生的DNA为线性分子。因此，如果你的目标是产生环状基因组，那么就会碰到障碍。

3. 将完整基因组植入酵母

酵母也可被用于接收及使完整非合成基因组增殖的宿主。首先，要将酵母载体引进细菌细胞的基因组，可以采取随机转座或者定向同源重组的方法进行。然后，携带了酵母载体的细菌基因组被植入酵母内（图2）。这一步需要采用精细纯化的基因组，基因组需固定在琼脂糖凝胶中，并从中分离以保持完整。但是，最近研究人员发现整个基因组可以从细菌细胞

体内基因组组装。纯人工合成的细菌基因组可以在不同物种的有机体宿主内生长及加工。此外，那些外来的基因组可以通过有机体自身的同源重组机制将重叠片段组装在一起。Itaya等人的研究中采用了开创性的方法，将非常大的非合成组件反复组装进枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）基因组，在其中他们几乎克隆了所有蓝藻集胞藻（*Synechocystis*）PCC6803基因组，基因组被分成四个长度为800kb至900kb的片段。Holt等人也采用了创新的方法，采用 λ Red重组法在大肠杆菌中组装了流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）基因组的一部分。这些方法都是按照顺序加入片段，然后在受体宿主菌株内进行部分基因组重组的。

在DNA分子组装中，需要从寡核苷酸序列扩展至整个基因组，研究人员采用了在酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中的非常高效的自然同源重组机制（图2）。所合成的两个细菌染色体最终都会被置入酵母中，酵母比其它任何体内重组系统都更具有优势，因其可以摄入并一次完成多个重叠DNA片段的组装。尤其引人注目的是，酿酒酵母可以一次摄入并将25个大型DNA片段（每个长度为24kb）在一次转化操作中完成组装。此外，酵母类遗传工具很容易获得，因此它也是在完成基因组克隆后，对这些细菌基因组进行进一步修饰的理想宿主。

直接植入酵母细胞胞质内，而省却DNA纯化过程（图2）。这一细胞融合方法减少了将细菌基因组转至酵母所需要的操作时间，并且提高了基因组转移操作的效率与成功率。如果能够使用无限制性内切酶的供体株（restriction-free donor strain），操作效率将进一步提高。限制性内切酶是可以对DNA在特定位点进行剪切的核酸酶。如果供体株含有限制性内

切酶系统，核酸酶可能在细胞融合过程中同时进入酵母细胞，并对酵母染色体DNA进行消化，从而杀死酵母。细胞融合方法可能对更大的细菌基因组尤其适合，因为更大的DNA片段更容易被体外操作中的机械剪切力影响。

将酵母载体植入一个天然的、仍在生长的细菌细胞内具有以下两点优势：(i) 不需要DNA序列信息；(ii) 只获得具有功能的基因组。但是，需要建立有机体的转化系统。如果基因组序列已知，还可以使用另外两个方法。第一，在细菌细胞将基因组纯化并采用单一位点限制性酶进行线性化。然后，酵母载体和线性基因组被共转化至酵母细胞，其中，酵母载体与线性基因组两端有重合序列。最后，在酵母内完成基因组重组（图2）。此外，基因组重构也可以通过在酵母内将重叠PCR产物进行组装，或者把转化相关重组（transformation-associated recombination, TAR）产物进行组装，或者将两种产物混合物进行组装（图2）。在TAR方法中，基因组DNA通过机械方法或酶的消化变成片段，然后与酵母载体一起共同转化进入酵母中，其中，酵母载体末端连接着想要获得的片段。我们会先合成一系列不同的载体末端，用于制备

互相重叠的基因组DNA片段，这些片段会被克隆到酵母中（需要时可克隆到大肠杆菌内用于增殖），然后将这些片段不断组装形成越来越长的片段，直到在酵母内形成完整的基因组。TAR方法与PCR比较所具有的优越性在于更低的出错率，以及可以比PCR产生更大的片段。当使用天然及合成组件重构基因组时，PCR和TAR方法显得尤其有用，因为这些组件之间的连接部分可轻易地在很多特定位点被打破。我们使用了一个天然和合成组件结合在一起的蕈状支原体（*M. mycoides*）基因组对不具有功能的合成基因组进行试错实验。

在酵母中克隆完整基因组。到目前为止，已经有很多细菌基因组被克隆进酵母，它们包括：生殖支原体（*M. genitalium*），蕈状支原体（*M. mycoides*），肺炎霉浆菌（*Mycoplasma pneumonia*），莱氏衣原体（*Acholeplasma laidlawii*），海洋原绿球藻（*Prochlorococcus marinus*）及流感嗜血杆菌（*H. influenzae*）。这些基因组大小从0.6Mb到1.8Mb不等，GC含量在24%至40%之间。



在酵母内克隆中，至少有三个关键因素决定是否能够成功克隆

不存在有毒基因的表达。有毒基因表达可能会弱化甚至杀死酵母宿主。然而，由于真核细胞内的转录与翻译信号与原核细胞内有所不同，因此，细菌基因表达应该尽可能在酵母中减少。此外，支原体内的密码子UGA并非翻译停止信号，而是色氨酸的密码子，这也大幅降低了酵母内有毒基因产物的风险，因为这样的基因产物会被截断。举一个有毒基因表达的例子，莱氏衣原体的整个基因组采用的是标准遗传编码，但是如果要把它克隆入酵母，必须先使编码细胞外核酸内切酶的基因失活才可以。

基因组大小。到目前为止，成功克隆到酵母内的最大细菌基因组是长度为1.8Mb的流感

嗜血杆菌。能够克隆至酵母内的DNA片段的长度上限还不知道，不过已经有研究者报道了长度为2.3Mb的酵母人工染色体被克隆。在细胞融合技术上的进展应该会使更大的细菌基因组的克隆成为可能，因为这一方法避免了转移裸露DNA时的剪切力。但是，处理更大的基因组时，可能会有更多有毒基因产物表达，此外，更长的DNA的复制也会使酵母细胞面临更多的存活压力。

GC含量。酵母的复制原点GC含量较低，这些复制原点大约每隔150kb就会存在一个，从而起始DNA复制，保证染色体的稳定性。GC含量在40%的细菌基因组已经被成功克隆。克隆长度为2.7Mb的细长聚球藻（*Synechococcus elongatus*）PCC7942基因组时，除了将GC含量达到55%的整个基因组序列进行克隆之外，还可以采用上文所述的PCR和TAR（图2）将长度100kb的多个片段连接起来进行克隆。长度大于200kb的片段可以通过插入酵母复制原点的方法保证复制的稳定进行。



在酵母内组装和克隆整个细菌基因组时，至少需要考虑五个因素

最终的设计方案是否能够让基因组在它自身的菌株环境内更快速地完成？这取决于菌株对转化及同源重组的遗传耐受程度、进行转化及重组所需要的反复扩增次数以及细菌的生长速度。

菌株是否容易获得？如果答案是否定的，那么唯一的选择就是合成菌株。

菌株是否为致病菌？如果是，那么最好不要在实验室内使用，而转而合成不含致病因子的菌株。活化后，可被用作减毒疫苗。

从大小和复杂性考虑，将基因组克隆至酵母内的可能性有多大？上述指导原则应该能够帮助研究者在方案设计时做出正确的选择。

将基因组激活并产生遗传工程菌株的可能性有多大？如果不能在激活后产生新的表达涉及指令的细胞，那么对基因组的重编程也就没有意义了。

4. 基因组激活

大部分有机体的基因组在其原有环境中都会被修饰，尽管有些比其它的更加高效。**Church**等人使用**MAGE**和**CAGE**（分别为多通路自动基因组工程与接合型自动基因组工程）对自然大肠杆菌基因组模板进行了体内编辑与进化。**MAGE**受细菌噬菌体 λ Red单链DNA结合蛋白 β 调控，把ssDNA寡核苷酸链定向转化至靶向位点，进行修饰。**CAGE**采取分段式方法，把已经经过**MAGE**修饰的大肠杆菌基因组片段结合在一起。

Boeke等人目前正致力于用合成DNA一段一段地、最终替换整个酿酒酵母（*S. cerevisiae*）天然基因组的工作。此研究的目的在于揭示控制真核细胞基因组结构及功能的基本原理。他们的方法中包括在每个非必需基因旁边插入*loxP*位点，在引入Cre重组酶后启动SCRaMbLE（有*loxP*介导的进化对合成染色体重组及修饰）等。

目前，包括哺乳动物细胞在内的生物细胞已经可以通过锌指核酸酶准确进行编辑了；此外，诸如下述的突破性技术进展的出现：转录活化因子——例如效应器核酸酶；成簇、规则间隔分布的短回文结构重复序列

（**CRISPR**）——**Cas9**系统，这些都会为基因治疗的进程铺平道路。

上文所述的方法与基因组激活不同。在基因组激活中，整个基因组表达产生能够自我复制的细胞，细胞具有来自基因组指令的性质。“基因组激活”这个词可以指的是基因组在宿主细胞内表达，或者在无细胞系统内，将非生命细胞机制转入有生命的细胞，并且在提供营养物质的条件下能够生长和分裂。困难在于需要找到一个具有兼容性的系统来激活整个经过遗传修饰的基因组。**Itaya**等人在枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）中克隆了蓝藻集胞藻（*Synechocystis*）基因组PCC6803；但是，大部分来自蓝藻集胞藻的基因都是沉默的，细胞并没有呈现其基因组带来的表型。这有可能是两个菌株不能兼容使用起始转录与翻译信号的原因。操作系统是启动和运行计算机的核心，而基因组就好比是细胞的操作系统，细胞环境则是激活和运行基因组软件的硬件。细胞质包含了所有表达基因组信息所需要的成分，基因组也包含所有产生和复制细胞的信息。这一切因素缺一不可。

5. 基因组移植

在真核细胞内，细胞核移植已经是很成熟的技术，也就是把供体细胞细胞核放入无细胞核的靶细胞内。与之类似的，我们也可以把某个细菌的基因组放入另一个之内，这一过程被命名为基因组移植。首次进行基因组移植的研究是把蕈状支原体（*M. mycoides*）基因组移植到山羊霉浆菌（*Mycoplasma capricolum*）内。在这个过程中，纯化的完整染色体被转移到受体细胞内，并在适于携带供体基因组细胞的环境中生长。细胞的生长与分裂使子代细胞

携带供体基因组或受体基因组。由于供体基因组经遗传修饰，包含一个抗生素抵抗基因，因此，只有那些含有供体基因组并表达抵抗基因的细胞才能在含有抗生素的环境中生存。

我们已经认识了一些在未来基因组移植技术中需要考虑和解决的因素，只有这样才能提高基因组移植的成功率。

核酶活性。受体细胞含有的细胞外核酶或者限制性修饰系统，可以在外来基因组得以

复制并表达产生相应细胞之前，就把外来基因破坏掉。把蕈状支原体染色体从其天然环境中分离，转移到山羊霉浆菌受体细胞内，宿主细胞内的限制性酶切系统没有把供体基因组降解掉，这是因为两者具有相同的限制性酶切系统，通过甲基化，起到了保护作用。但是，如果把供体基因组引入到酵母细胞内，其DNA甲基化酶不会表达；结果是限制性酶切位点缺少甲基化保护，因此会被受体细胞内的限制性系统消灭。解决这个问题可以通过两种方法：第一，在移植前对供体基因组进行甲基化修饰；第二，构建不含限制性酶切系统的受体细胞。

细胞壁的存在。有些受体细胞可能含有细胞壁；那么在细胞接受工体基因组之前应该想办法把细胞壁去除或者削弱其屏障作用，在完成基因组移植后，再重新生成细胞壁。山羊霉浆菌细胞不含细胞壁，因此能够成功接受基因组移植。

基因组大小。较大的基因组更容易损坏。但是，将更大的染色体嵌入琼脂糖凝胶，可以较好地对其进行纯化并保持完整。多聚阳离子有利于保护大的DNA免受机械剪切力损伤，在对大的纯化DNA分子进行操作时，可以考虑这一方法。把基因组从细菌转入酵母时，也可以采用细胞融合方法减少供体基因组的处理步骤。

供体与受体菌株之间的相似程度。受体细

胞必须具有可以表达和复制供体基因组的细胞机器。例如，受体细胞的复制、转录和翻译机制需要和供体基因组所携带的复制、转录和翻译信号（例如复制原点、启动子、终止子及核糖体结合位点）相互兼容。此外，供体与受体细胞还要使用相同的遗传密码，并且能够获得足够的必需tRNA。如果受体细胞不能进行同源重组是最为理想的，因为这样可以减少供体与受体基因组之间的重组可能性；这种情况下，供体与受体可来自相同菌株。

在这一研究领域中，随着经验的积累，我们希望能够设计并构建一种通用受体细胞，这种细胞可以通过接受特定移植工体基因组，而转化成一类型的菌株细胞。这种通用受体细胞需要能够和多种类型供体基因组兼容，没有核酸酶的活性，也不能进行同源重组，并在经过优化处理后，最为适宜摄入基因组DNA。供体基因组需要含有自我激活基因，该基因利于在受体细胞环境中进行表达。这些基因可以参与多种参与转录（例如RNA聚合酶及 σ 因子）及翻译（例如核糖体及氨酰基tRNA合成酶）关键成分的表达，而且，一经表达，它们可以快速启动供体基因组内其它所有基因的转录和翻译。如果基因组设计原理更加清晰（见下文），更实用的方案可能是对供体基因组序列进行修饰，以便使其含有的必需表达信号（例如启动子、终止子及核糖体结合位点）能够被受体细胞内的转录及翻译机制准确激活。通用受体细胞的一个主要优势是，可以建立标准操作流程，在更大的范围内使用，因而更具有实用性。

6. 非细胞基因组的激活

接受移植的基因组细胞的所有性质都由供体基因组控制，受体细胞留下的任何表型性质都会在细胞生长与分裂过程中被逐渐稀释。这就如同DNA软件自己建立的硬件。因此，任何构建于纯化学合成细胞器的细胞会与含有

化学合成基因组的细胞具有相同的性质（图3）。无论如何，在无细胞环境内构建生命的想法还是十分吸引人的，只是要想用非生命物质创造细胞，需要我们具有更加丰富的生物学知识。细胞各组成部分可以分别合成并直接进

行检测。Church、Forster及Jewett已经利用体外化学合成方法获得了最简单的细胞。在进行基因组移植之后，还需要明白有哪些因素会

控制基因组激活、通用受体细胞的生长等，这些都可以促进对非细胞基因组激活的研究。

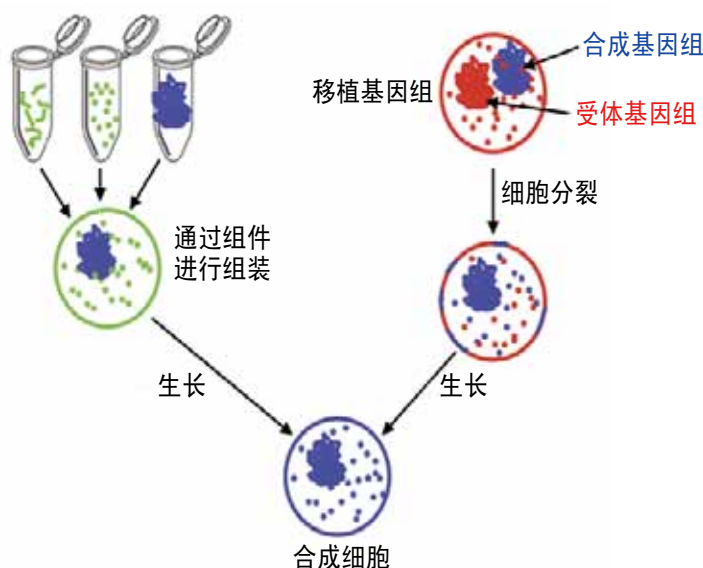


图3 在非细胞环境中激活的合成基因组与通过基因组移植后激活的基因组产生同样的表达产物与性质。

7. 基因组设计

合成生物学的终极目标是能够设计和自由构建DNA，使DNA能够产生具有特定性质的细胞（图4）。到目前为止，DNA设计在基因及生物路径水平，以及细菌噬菌体基因组遗传工程操作方面已经取得了巨大的进展。但是，尽管在基因组及合成生物学研究方面已经有了很大的进展，我们仍没有全部了解具有自我复制功能的细胞内的所有基因的功能。

研究依然还在为构建最简单的细胞而不断进行试验，最简单的细胞意味着细胞内只含有使细胞能够独立生存下去的必需物质。这是在1995年对生殖支原体（*M. genitalium*）基因组进行测序后就开始的工作。生殖支原体的基因组与最简单细胞所需基因组十分接近。但是，在当时，研究人员没能激活生殖支原体基

因组，有可能是极慢的生长速度所造成的；现在，15年过去了，我们已经拥有各种基因组合成和激活工具，对来自蕈状支原体（*M. mycoides*）基因组序列的基因组设计进行构建和检测。现在，研究人员采用蕈状支原体取代了生殖支原体，用于构建最简细胞。在此系统内，设计-构建-检测流程在全基因组水平上前所未有的顺畅。研究人员可以任意设计新的基因组序列，然后进行基因组移植，对其功能进行检测。克雷格·文特尔研究所（J. Craig Venter Institute）和合成基因组公司（Synthetic Genomics, Inc.）的科学家们已经不再仅局限于蕈状支原体基因组的研究，而是开始检测成百上千种新的基因组组合，以期构建最简单细胞。最终的目标是能够合成一个

细胞，揭示其中每个基因的功能，从而能够利用计算机模拟构建最简细胞。这将极大地帮助科学家理解细胞的工作过程，以及如何对其进行设计。最近，Covert的小组展示了用计算机模拟天然生殖支原体的成果。

如果能够获得最简细胞，想了解 and 预测细胞的各项生命活动就容易得多。最简细胞系统可以用做摸索基因组设计原则的检测平台，并具有以下可预测的功能：（i）将具有相似功能的基因分类，构建可以互换的遗传模块；（ii）改变遗传密码；（iii）修饰基因组，使其更容易在宿主有机体内进行化学合成与组装；（iv）修饰基因组，使其在受体细胞或非

细胞环境内被激活；（v）改变调节元件，从而改变表达谱；（vi）增加基因或遗传路径，激活后发挥作用。其中，最后一点格外吸引人们的眼球。因为，如果可以做到这一点，意味着我们将可以用最简细胞作为构建更加复杂有机体的基础平台。例如，能不能通过增加一个“细胞壁遗传模块”，就产生一个具有细胞壁的最简细胞？对任何新的基因组设计的构建和检测功能将会十分强大。这也将帮助我们创建基因组设计原理，让研究者更好地了解相关的生物学知识，构建具有特定“程序”功能的合成细胞。

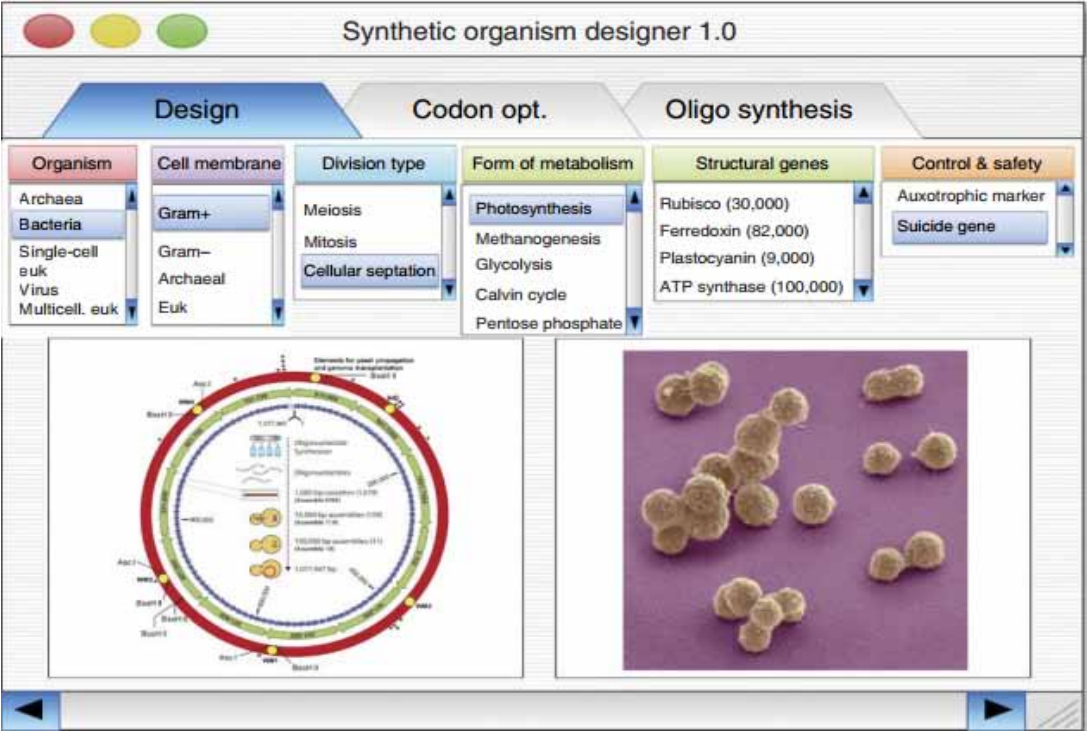


图4 未来可用于按需设计合成有机体的软件。

8. 结语

科学家们已经掌握了读取遗传密码的技术，现在正在迈出下一步——合成生物学家试图尝试书写遗传密码，构建自然界中不存在

的，具有新的或提高了功能的有机体。尽管合成生物学家还在学习如何按照自己的预想设计DNA，尤其是大的遗传路径或基因组，但

是，技术的发展已经使这一切成为可能。在研究过程中，已经出现了一系列DNA合成与组装的新技术。这些方法已经有了很广泛的应用，例如：构建合成流感疫苗病毒以快速应对流感大流行、遗传路径、细胞器基因组、病毒基因组以及细菌基因组。

合成基因组学的发展将把合成生物学带入全新的阶段，我们可以对全基因组序列进行设计、书写和激活，建立细胞的全新生物运行系统，使细胞携带“编程”好的指令。为了实现这个目标，我们必须获得基因组设计、合成、组装及激活的更有效的工具与技术。技术的进展必须使DNA合成成本得以大幅下降，就犹

如曾经的DNA测序成本一样。只需要新的自动化DNA处理技术，就可以将低成本的寡核苷酸（例如小量产生于微芯片的序列）转化成精确的合成DNA片段。这样一来，我们就能够对成千上万的基因组组合序列进行构建和检测，而不必被高额的费用阻碍研究进程。只要能够实现我们所购想的合成基因组学远景，我们就能够获得具有其它非凡性质的细胞。其应用前景是不可估量的，我们已经看到其所具有的巨大潜力，例如把二氧化碳、植物中的生物物质及煤转化成具有更高价值的产品，如药品、食物、生物燃料、塑料或化学品，或者用于生产新的疫苗。





三、用合成生物学方法研究自然发生论

经过四十亿年的进化，地球上已经形成了一个由精妙优化的分子所组成的生物圈，确保生命体能够不断进化，蓬勃发展。一直以来，分子生物学家都想通过对各分子的功能及相互作用进行研究分析，从而更好地理解生命系统的性质。然而，最终发现这些分子组成和系统都来自于共同的祖先（**last universal common ancestor, LUCA**）。如果没有在地球或其它什么地方发现并非来自共同祖先的生物体，那么，建立生物学的通用原理及法则是十分具有挑战性的。用**Carl Sagan**的话说，尽管我们拥有令人惊讶的生物学多样性，但是生物学是具有一致性的，它的通用普遍性在整个宇宙内都可见到。然而，如果不再只是局限于传统习惯使用的分析解构方法对现有生命进行研究，而是通过修饰、重构甚至从头构建的

方法，我们将有可能获得全新的视角，并最终对生命系统的普遍原理有一个更透彻的理解，这正是合成生物学所能带给我们的新世界。

从基因工程出现以来，人类对现有生物体加以人工修饰的技术一直都在飞速发展。通过生物学技术，我们可以按照自己的想法对基因序列进行插入、删除和修饰，从而启动生物体内新的通路，产生新的表型和代谢产物或者对其计算机模拟计算。在**DNA**固相合成及组装领域的进展，已经使我们获得了人工合成的第一个单细胞有机体基因组。这些技术可以以前所未有的速度与效率，帮助我们对基因组内的基因排列及所处环境进行研究，在我们已经掌握的遗传中心法则的基础上，为我们提供大量的生物技术视角并促使我们加以新的探索（图1.a）。

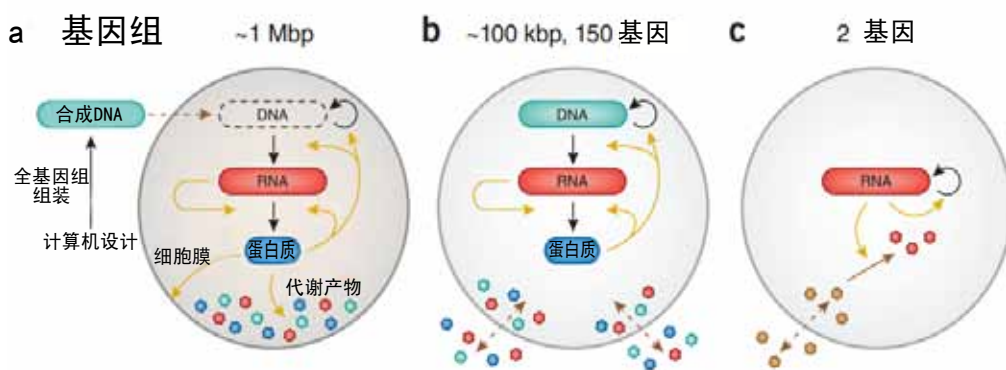


图1 更加简单的合成生物系统。（a）DNA如同软件：利用合成基因组重组构建细菌。所有改变都沿着遗传学中心法则向下传递，通过对信息系统、新陈代谢及细胞膜的改变来赋予细菌新的表型（黑色箭头表示信息传递；橘色箭头表示催化过程）。（b）一种简化的异养细胞，不含代谢产物，只包括维持DNA复制、转录及翻译所必需的物质。（c）一种高度简化的RNA有机体：建立于单个生物聚合物（RNA）的一个合成原生细胞，拥有动态膜囊结构。RNA复制酶可以自我复制，也可以对代谢核酶（合成酶）进行复制，从而产生用于合成遗传物质的“原材料”（通过活化或者捕获可透过细胞膜的前体物质）。如果活化的“原材料”可以透过细胞膜，那么合成酶就不再需要了；或者，如果活化的“原材料”可以进行无生物酶的RNA合成，那么也就不再需要合成酶。

这些进展无疑会使人们产生这样的疑问：在我们前进的道路上，到底可以在多大程度上偏离现有的分子生物学理论？新的化学合成物质，例如非天然氨基酸及碳水化合物，可以被加入到单细胞及多细胞有机体内。在一个实验中，研究者甚至用非天然碱基将基因组中的某个碱基完全替换掉。核糖体工程，全基因组重编码以及遗传学字母表的扩充，这一切曾经的“天方夜谭”，如今都有可能变成现实。所有这些进展能走多远，取决于生物体是否能够稳定遗传被重新编码的遗传物质，并且能够接受、适应由此产生的新的物质与功能。此外，需要将这些新物质整合到原有的生物学通路中去，无论是通过替换还是重建新的通路。这些研究结果将有助于揭示生命的“极限”——能在多大程度上接受遗传密码的扩展，以及耐受由此新产生的化学物质及遗传信息储备。

当然，这些研究方法目前仍然是植根于现有的生物学基础之上的，由此可能产生一定的局限性。如果能够采取百分百的生物合成方法去进行研究，则更有可能揭示和阐明各类生物学原理。这种完全的合成方法应该是这样的：构建简单的细胞，细胞内仅含有维持生命所必需的组成成分。目前，科学家利用细胞膜模型已经可以构建出转录、翻译及新陈代谢活动，但还无法再生那些可以支持复制的蛋白质或翻译因子。如果想进一步达到上述目的，还需要在一个很小的细胞内装入足够支持细胞内复制、转录、翻译所需的组分以及其整个编码基因组（图.1b）。这些是满足细胞得以对遗传信息加以遗传、表达所需的核心“装备”，是生物工程的基础。但是，尽管从表面看来，这样的细胞已经比现有的天然细胞要简单得多，但这样一个半复制细胞想要生存下去，还是需要拥有长度超过100kb的基因组，从基因组表达出100到150个基因片段。这是否意味着，生命的基础注定是如此的复杂，无法再简化，抑或是得到这个结果的原因，恰恰是由于我们的研究依然是植根于现有的生物学基础呢？换句话说，生命是否必须是一件复杂的事情？

在构建更为简化的细胞所做的研究中，还可以采取更加颠覆传统的方法。那就是采用完全合成的新物质，去构建展示同样生命特性的系统，这一直以来都是我们对生命认识的一个挑战。抛开现有生物学理论的束缚去进行全新的研究，看起来可能不那么现实，但事实上，也许是十分具有指导意义的，也许会让研究者更加自由地运用现有技术。目前来看，生物的复杂性体现在我们要从蛋白质、RNA和DNA三个水平上去实现支持与整合，但是，如果我们能退一步想想，不再受这个遗传中心法则的约束，也许能够找到更加简单、高效的生命模式。

当然大家首先会想到一个问题：生命的维持到底需要哪些必备条件呢？生命的一个特性在于其可以自我复制并自由生长与发展，这个过程依赖于可遗传的分子记忆所推动的生物进化。想要使合成生物系统具备这一特点并非易事，也许我们可以从地球上生命的起源寻找灵感。关于生命起源，其中一个理论叫做自然发生论（abiogenesis），从中可以了解在生命形成初期，地球上的化学及生物物理环境。模拟这样的条件构建一个简单的进化系统，可以帮助我们了解从无生命物质到产生有生命物质的可能性与合理性，以及两者如何相互推动发展的过程。

现存生物学的研究热点似乎已经不是DNA及编码蛋白质，而是可以充当遗传物质与代谢酶类的RNA的天下了。受到这个“RNA世界”的启发，研究者提出了合成一个只含有自我复制RNA系统的原生细胞（图.1c），这个RNA系统同样可以启动动态被膜的生长分化，复制过程更加快速，进而驱动原生细胞分化以及随机分类遗传，与L型细菌生长有所不同。这一设想为解决生命的基础问题提供了框架：我们应该构建一个复杂程度最小的，使生命得以维持、进化的系统。为了实现这个目的，合成生物学家需要构建和整合新的生命物质：例如，一个可以复制的RNA基因组。

仅仅使用RNA作为遗传信息储备物质进行自我复制是否真的可行呢？有实验对一对交叉催化的RNA连接酶进行研究，它们在各自的核酶中催化对方两个片段的连接过程，然后通过重组得到新的连接酶表型。也有人报道在研究固氮弧菌（*Azoarcus*）内具有自我剪切功能的内含子时，发现自我组装的协作通路。这些RNA的和生命相似的生长现象为我们带来了希望，也许RNA可以参与复制过程，但是这些系统的进化潜能目前看来还是受到RNA固有的功能的限制。

想要使RNA这个遗传系统自由进化，可以通过借助通过碱基配对获得的将近完成的信息，使RNA能够从单体分子进行自我复制。也许最值得注意的此类复制行为是在体外用随机RNA序列合成一个聚合酶核酶的例子。最初，只能够复制14个核苷酸，在经过无数次基因工程操作及演化后，才能够获得足以合成具有酶类活性的RNA的片段或者比聚合酶核酶自身还要长（多于200个核苷酸）的RNA，这一结果也显示了此类核酶的合成潜能。

也有人提出是否在简单生命形式中的自我复制和进化需要相对复杂的“复制酶”的参与。早在20世纪70年代，就有科学家开始采用完全不具有生物酶类活性、化学的方法研究RNA复制，而且近来也在这一领域出现了重大的进展：人们开始使用非天然连接方式及碱基物质，逐步移除水解产物后，发现了一些辅

因子，它们可以参与原生细胞模型内模版导向的RNA合成。当然，无酶复制体系目前也具有相当大的局限性，例如在复制速率和保真性上都十分有限，这势必影响这个体系能够承载的基因组的大小。

此外，无论是有酶类参与还是没有酶类参与的方法，都需要克服一系列的难题，才能够真正实现RNA系统的复制与进化。在所有的困难中，应该说最大的一个是需要克服模板二级结构的抑制作用以及其解链过程中的问题。这就需要有相应的酶类物质或其它物理化学方法能够解开模板RNA的双链结构，同时促进RNA折叠及碱基配对，这是合成所必备的条件。新近的一项研究结果给我们带来了曙光，而且看起来相当简单。研究显示核酸复制（以及原生细胞膜的组装和分化）可以因具有一定的异质性而得到促进（helpful heterogeneity）（图2）。化学异质性可出现短暂2'修饰或者改变了的RNA骨架结构连接（2'-5' vs. 3'-5'），这些可以使产生的双链结构部分稳定性下降。底物组成中的异质性可以通过寡聚物间的相互作用产生有益的性质，底物可以是加以人为控制的单体也可以是动态的多底物系统，例如前文所述的固氮弧菌系统。的确，这样的“系统化学”方法已经在RNA合成元件的研究中产生了长足进展，而且很可能也是RNA自我复制过程的关键。

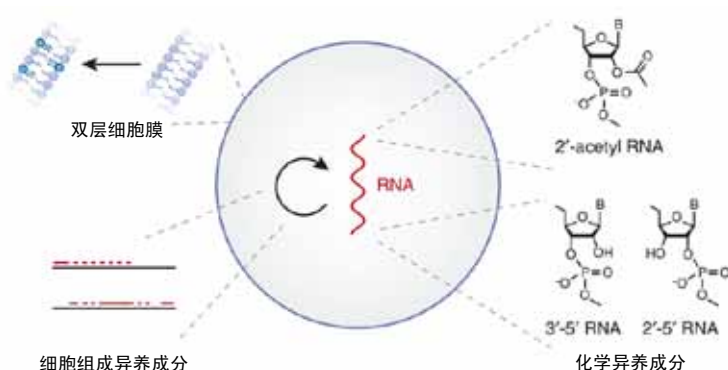


图2 RNA原生细胞内的异养模式。从左上角按顺时针方向依次为：细胞膜的双层磷脂结构有助于细胞的生长及进化竞争优势。2'-乙酰RNA可以提高特异性以及产生易于解链的双链结构，从而促进RNA的合成。另外，RNA合成也可以通过2'-5'连接的加入而得到促进，拥有更多此类连接方式的分子可以充当更好的模板。RNA合成可以从链的任何一端，甚至模板片段上的多个位点起始，而不需要固定的某一个启动位点，这样可以提高复制的速率。

如果高效的RNA复制可以在细胞膜模型中实现，那么我们就可以利用合成物质构建一个原生细胞系统，使这个系统具有生命类似的性质：如生长、分化、遗传以及进化。在过去十年中，依托原生细胞进行的此类研究已经取得了很大进步，例如，这些细胞可以生长、分化，具有渗透性、稳定性，并且具有兼容非生物酶类的核酸复制的能力。一个原生细胞内的RNA复制酶同样可以转录其它核酶，促进产生新陈代谢产物——例如RNA复制所需的物质——从而推动RNA的复制过程（图1.c）。这样的原生细胞可以帮助我们从系统整体的角度对相互作用的物质进行评估及进化角度的优化。这相当于提供了一个试验平台，生命早期分子生物进化的基础问题可以在这个平台上进行研究，例如侧向基因转移的作用，利用储存于DNA的稳定遗传信息的好处以及蛋白质所具有的更高的催化效能等。

细胞膜功能、遗传信息复制以及物质新陈代谢都是现代生物学中的共同特性，也许现在已经是时候用合成方法构建一个简单细胞了，正如上文所设想的那样。但问题是这三个已经被我们奉为真理的必备元素是否真的是生命体维持下去所必需的呢？例如，假设细胞膜具有合适的渗透性，可以使外来的合成“原材料”进入细胞，那么一个原生细胞内的复制酶就可以在没有代谢产物生成的情况下，发挥生命体所必需的功能，用这样的方式支持异养型的生命形式。进一步想一想，如果不需要代谢产物的参与，那是否还需要细胞膜呢？复制过程所需要的物质处于共同的特定区域，是达尔文进化论的前提，因为只有这样才能保证在进化过程中因选择而产生的编码表型的表达。在细胞内划分各自不同的功能区域有利于将相关分子聚集在一起，从而抑制那些没有活性的或感染细胞的分子的扩散。但是，我们现在发现我们可以采用其它物理方法对细胞内的不同功能区域进行划分（例如，无机物、冰及凝聚体），这样就使得细胞有可能更加简化，甚至连各种

细胞器被膜都不再需要。的确，有细胞膜的原生细胞看起来更加现实，因为它们和真实细胞一样，但是，在某些情况下，某些有机体可能真的不需要细胞膜的存在。

原则上讲，无论是代谢产物，还是遗传物质，或者是细胞结构，都可以不受自然化学的限制：利用无机化学及超分子化学知识，可以构建与细胞相似的结构，细胞生长的方式也可以有所改变，这些都可以与我们在自然生物体内所观察到的完全不同。同样的道理，我们可以利用完全相反的立体化学方法去构建生物系统，来制造出那些与现存生命体完全不同的镜像生命（mirror life）；抑或是采用非天然核苷酸来策划遗传信息的储存功能，用非天然氨基酸组成蛋白质或者其它的编码聚合物。这些方法与传统上关于生命起源的理论背道而驰，但可以在很大程度上帮我们去揭示天然蛋白质及核苷酸在维持生命上到底能够起到多大的作用，在生物体的复杂性和保真度之间是否可以找到最佳的平衡点，或者引导我们以新的视角去看待进化的过程与原理。

尽管这是一个新兴的领域，但是某些适用于所有生命体的原理已经开始被发现。这包括基因组与基因表型的主导地位，以及生命体的可塑性，例如它们既有赖于基本核苷酸及蛋白质的存在，也可以接纳人工合成的原生细胞膜所拥有的新的性质，以及新型遗传物质复制体系和复制酶。不容置疑，体外生物进化研究方法的发展可以帮助我们分离合成的物质，再加上高通量测序技术的出现，使我们能够以前所未有的视角和深度去更好地了解进化的过程、生物体的适应能力，对出现的新的功能表型及相互之间的关联也有了更佳的认识。

“RNA世界”的设想告诉我们将RNA作为遗传物质加以利用去合成细胞是可能的，这也刷新了我们对进化过程中生物体的传统认知，RNA也可能参与了地球上早期生物的形成过程。尽管我们对生物体所需的分子构架的细节还不够了解，但已经成功地构建了合成系

统，且这个系统拥有与生命体类似的性质：如
异养生长、自我复制、遗传及进化的性质，这

些成果对于揭示生物学及自然发生论的基本原
理已经具有非常重要的指导意义。



百态 · 频道

www.LifeOmics.com



四、合成生物学的两大主流方法

合成生物学是通过对各类生物学组件进行修饰和重组来构建具有新的功能的生物系统的科学。本文将探讨两种主要的观点，探讨如何能够对这些组件进行设计利用，从而有效、可靠地获得具有特定性质的有机体。

主题简要

- 合成生物学的目的是按照人类的需求使有机体产生某些有益的功能——例如产生抗体从而进行污水净化。
- 一种方法可以称为是“理性设计”，具体操作是设计产生具有各种功能的“组件”，按照需要，在有机体内进行组装，从而产生可预测的、可靠的性质（图 1a）。
- 另一种方法称作“定向进化”，将产物功能不明的突变基因引入靶向位点，构建突变基因库，然后进行人工筛选，从而获得具有特定功能的产物。通过多次重复上述过程，使得突变产物具有最优化的性质（图 1b）。
- 关于上述两种方法哪种更为有效，意见各异。

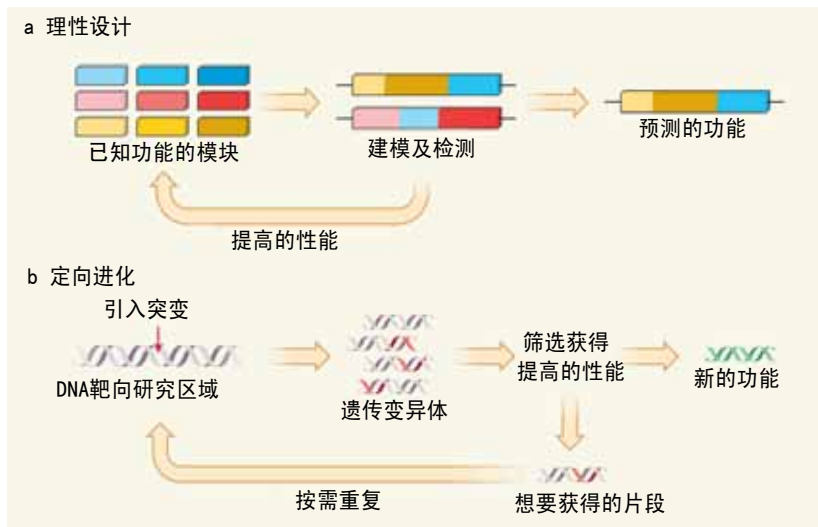


图1 生物合成有机体的两种方法。a，在理性设计中，我们通过构建模型及对其检测，对生物学“元件”（如基因、基因调节因子和蛋白质）进行研究来了解它们的功能。以此获得具有不同功能的“原料库”，或者由多个部分组成的模块，然后把这些元件进行不同的组合，从而获得具有相应功能的产物。b，另一种方法是利用进化的力量来指导合成生物体的合成方向。对靶向区域（例如，一个基因）进行随机突变，产生含有多种突变的细胞。然后对细胞进行筛选，寻找具备某种功能或功能得以提高的突变体。那些不含此类突变的细胞被筛选；含有目标突变的细胞则被保留，继续培养并进入新一轮以及数轮的突变及筛选过程，从而获得最终的目标产物。

1. 理性设计

“理性设计”方法是合成生物学的支柱理念。这个方法的意义到底是什么？作为此方法的支持者，我们认为人类可以顺应自然，利用大自然的规律来告知生物体应该产生何种遗传回路、蛋白质乃至生命形态。设计者应该从失败中学习，总结经验，从而指导下一步的设计。与此方法不同的是，以进化为核心的方法中，则更像是一系列的权宜之计，每一步的改变及产物都必须能够满足让生物体存活的要求，任何不能满足这一要求的中间产物都是不被允许的。

理性设计依托于生物系统是由不同元件组装而成的这一理念。基因被定义成基本生物学单位。但是，技术的突飞猛进让人类得以对DNA进行操控，从而发现了许多其它细胞调控元件，比如控制基因表达的启动子，促进蛋白质生成的核糖体（细胞内合成蛋白质的细胞器）结合位点等。理性设计方法的支持者们最希望的是能够对这些元件进行透彻的理解，从而能够合理地进行组装，就如同一位制造一个具有某种功能的机器的工程师。值得高兴的是，这个希望已经开始成为现实——例如，在一个系统内把依赖于两个稳定状态的简单基因回路进行组装。最近，我们采用这些方法设计了一个细菌，这个细菌通过进入动物消化道可以感知动物是否曾经摄入过抗生素。

但是，我们也开始意识到仅仅是理性设计

这个方法，对于合成生物学而言是不够的。除此之外，还需要物理学原理、自然生物系统、计算机模拟等很多方面的知识。在合成生物学的“工具箱”里，还有可能包括定向进化或随机变异的相关技术，但这些方法往往受到样品量的限制：在有些动物实验或临床试验中，我们所感兴趣的产物产量恰恰是非常少的。

比较理想的状态是，在生物系统设计过程中，合成生物学家可以对大自然操控生物体的方法和途径了解得一清二楚，并加以利用。这需要研究着对基因表达、蛋白质结构及酶的动力学等知识极为精通。虽然对于这些领域，我们已经有了较为透彻的了解，但得到相应研究成果的科学家们彼此缺少互动交流，或者所使用的语言不为生物工程师所理解。

此外，大部分科学文献的书写都是为了让人们对自然现象有一个更好的理解，使之少一些神秘色彩，而不是为了给生物工程师以理论上的指导。实验数据及方法没有形成完整的体系，被淹没在一大堆卷宗中。因此，刻不容缓的就是将已有的实验数据进行整合，并转化成生物工程师能够使用的信息。

在过去的50年里，我们经历了生物学知识爆炸式的发展，而且主要依赖公用支出的支持。如果不能将这些知识转化成现实生活中有益的应用，人们自然会认为这是一种浪费。因此，现在是对公共投资进行回报的时候了。

2. 定向进化

生物基因组就好像是写满了“如何”指令的伟大著作：如何将物质和能量进行转化，从而产生具有自我修复、自我增殖功能的产物；如何在各种不同的环境中发挥作用；如何在更长时间内进行调节和适应。生物在进化中积累了大量的诸如此类的方法指南。因此，我们有

理由相信，进化过程能够帮助生物体获得新的指令，让生物体获得新的性质和功能。定向进化的结果是理性和可预测的，虽然在这个过程中，可能会出现不按照既定路线进行的基因改变。

那么，合成生物学家在书写新的生物学指

令方面做得如何呢？应该说我们一直在取得新的进展，现在我们能够更好地合成成长的DNA片段，并将其插入多种有机体内，在有机体内被读取或发挥功能。不过我们现在还处于起步阶段，如果拿写作来打比方，那我们就还只是停留在摘抄原文的好词好句的水平。我们还不具备合成一个可以和大自然相媲美的酶类或者构建一个生物学通路的能力。大自然的“写作”功力是如此深厚，有些人评价为繁复晦涩，令人难以读懂，但却是行之有效的。而我们还在学习如何执笔。

造成这一现状的原因也很简单：在生物学中，每一步细节都十分重要，而我们现在还没有把它们弄懂。目前，人们还无法预测在某个酶类中所发生的单一突变会带来怎样的改变，也不确定将某个基因加入到有机体内成百上千的基因中所造成的影响，因此，理性设计方法是一个很难实施的选择。把生物理解成“模块化”是个美好的愿望，但是我们将生物学组建进行整合的艰难努力往往却给了我们恰恰相反的结果：生物体并非是简单的元件拼装。通过人工构建生物系统，以期解决某些特定问题，例如生产抗疟疾药物或者通过微生物途径寻找新能源等，这些研究包含着多年的实验及不断出现的失败。想要真正发挥合成生物学的潜力，需要我们对每一步细节的深刻理解。

可以这么说，没有对生物体功能细节划时代意义的了解，理性设计是无法走远的。幸运的是，我们无需等待。进化本身就是一个通过

时间进行检验的有效工具，从而帮助我们了解具体细节，我们可以利用它在实验室内先回避掉关于基因如何最终对功能进行编码的理论缺失。在多代基因序列中积累有利突变是常见的方法，在一定程度上，它把“段落摘抄”转变成了“原创”，而且在多个复杂水平上都被证实是有效的。例如，构建一个可以从基因组中切除HIV的DNA编辑酶，或者优化多酶生物合成路径。可以说，定向进化方法已经取得了一些进展。

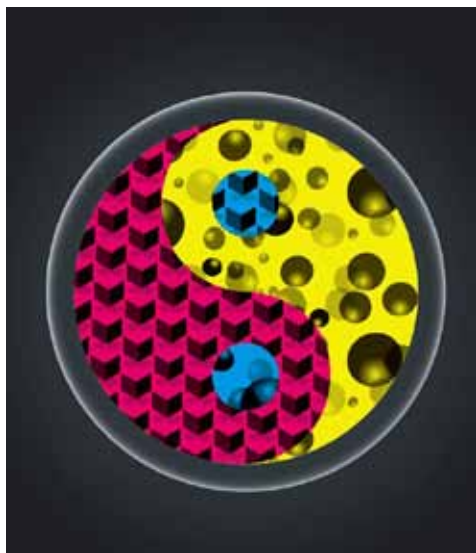
事实上，进化生物工程思路与“理性设计”并不是完全对立和互不兼容的；事实上，它们两者具有高度的互补性。定向进化首先需要进行合理设计，设计方案越好，进化发展越容易。此外，在定向进化方法中，也需要通过理性设计思路对目标基因进行寻找。如何确定靶向突变基因？有多少基因需要突变？在此过程中，我们如何评判实验结果？定向进化和理性设计甚至拥有共同的基础，例如，通过计算机设计得到突变基因库，可以加快进化过程。

只要拥有好的设计开端，定向进化将是合成生物学内最佳有效且直接的方法，而且对于生物学底物——也就是在同样的生物路径中产生的产物尤其有效。生物体拥有高度的进化特性，我们必须努力发掘这一特性，犹如数千年来我们对其它一切生物所做的那样。一名作家最好的朋友是一位好编辑——合成生物学家最好的朋友则应该是定向进化方法。





五、关于合成生物学的精彩观点集萃



是时候终止这场关于合成生物学的论战了

Volker ter Meulen, 国际科学院组织共同主席

若想要合成生物学蓬勃发展，现在就需要思考并决定如何规范和支持这个新型的领域。

人工酵母染色体的出现，标志着合成生物学正在朝着大部分科学家所希望的方向迈进：科学最终能够造福社会。该领域的研究者们已经发现了如何使用更加便宜的方法生产药品，并在多种应用上取得进展，如水的纯化处理及材料设计等。

但是，合成生物学一直都是备受争议的学科，这将阻碍其进一步发展。环保组织抨击这一学科将对人类健康及生存环境带来危害，并且呼吁全世界立即中止与此相关的研究。这似乎是科学发展过程中经常出现的问题：我们曾

对遗传工程产生过同样过于夸大的恐惧，未经仔细分析，默认其带来的风险，由此采取过度谨慎的限制政策，从而阻碍了创新研究，这不仅减缓了新产品的研发速度，也对基础科学产生负面的影响。

围绕合成生物学展开的争论，目前进入了批评阶段。保护生物多样性的全球框架组织——生物多样性公约缔约国会议（Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity, CBD）目前正在寻找可能的限制方案，并在召开的会议上阐明自己的立场。但是，想一想之前人们对待基因工程作物的态度，很多科学家担心政策制定者会一味听取环境保护组织缺乏数据支持的意见，而制定出繁杂而不必要的规范。为防止这一结果的发生，我们需要对合成生物学的风险和效益进行客观、有数据支持和平衡的评估，无论在CBD会议之上，还是会议之外。这意味着我们必须要让科学发出它的声音。

为立即展开对话，全球科学院联合组织（Global Network of Science Academies, IAP）已经发表了一份立场声明（详见go.nature.com/tmvhf8），这份声明来自欧洲和美国的成员研究机构。我们（本人是IAP的联席主席）希望这份声明可以让研究者们展开讨论，一起思考如何将研究发现和科学证据结合到政策制定中去。这不仅包括对研究和创新的管理，也包括在相关基础设施和培训上的投资的规范。

IAP代表了世界各地总共106个科研机构，希望在全球相关政策制定中扮演更加主动的角色；去年，我们也发表了一份类似的立场声明，是有关抗生素药物抵抗的。

对于合成生物学，我们首先需要解决这几个问题。第一，合成生物学的学科范畴需要界定。我们将其描述为人工定制生物学系统的构建，该系统具有新的或更高级的功能，在构建过程中采用工程学及化学合成的基本原理。

这个目标也许是崭新的，但很多具体技术则是来自现有的研究领域，例如遗传修饰。这意味着，正如有些人指出的那样，这一学科并非完全没有规则。事实上，绝大部分情况下，它都受到现有规则的制约。例如，遗传修饰的有机体的应用方面就受到卡塔赫纳生物安全议定书（Cartagena Protocol on Biosafety）的制约。

认识到合成生物学中所使用到的主要方法是受到控制的，这一点十分关键，因为这将直接否定公众对其安全性质疑的论点。此外，在法律法规与科学家及科研机构的自我管理之间寻求平衡点也显得十分重要。（IAP及其他组织都发表了相关的建议，旨在推动个人与机构的行为准则的建立。）

第二个必须考虑的因素是如何界定合成生物学研究成果的所有权以及如何共享资源。目前的情况是一种两相混合存在的状态：一方面是沿袭了生物科学传统的专利意识；另一方面是工程及软件研发领域对开源与共享精神的维护。全世界的研究者通力合作构建合成酵母染色体的事实，向我们表明学术界的资源共享具有怎样的重大意义。

随着合成生物学的研究进展，必将会产生各种游离于现行规则之外的新的技术与工具。IAP指出，有理由相信，新的技术会使研究更加精确地进行。对基因序列、细胞及有机体更加可控的修饰，会使“个性化定制”产品的开发更加容易，并减少不需要的或预期外的副产物及功能的产生。因此，未来合成生物学技术及产品会更加容易进行调控、管理及审查。

IAP讲到的最后一个因素是，全世界各研究资金提供机构应该看到合成生物学的前景，并对该领域提供资助，也对从事该研究的工作者提供资助。投资还应包括社会科学及人文科

学领域，关注生物学家“创造生命”的伟大工作，从而找到更好地就此话题与公众交流沟通的方式。

综上所述，上述举措将确保制定有关合成生物学更加合理的政策，从而减少任何重大进展所带来的风险，同时也保护和激励了研究者的研究及创新动力。

吹响生物学家的“集结号”

James J. Collins, 波士顿大学生物医学工程教授

提到合成生物学，人们往往想到的场景是工程师与生物学家共同合作，构建具有某种有益功能的遗传通路。事实上，在这个领域中，还没有多少生物学家真正参与进来。而这个事实正是阻碍合成生物学进步的原因。目前，我们对生物学的了解还不够多，还不能使合成生物学成为真正意义上的生物工程学科目。

合成生物学更像是一门工程学科，而这种倾向也已经给这个学科带来了引人注目的成果。比如，全细胞生物传感器，可以合成抗疟疾药物的细胞，用于驱散危险的粘连生物膜的微生物等。

在设计以上成果的过程中，工程师需要将系统看作是一个黑匣子，这个黑匣子连接着输入与输出。对于黑匣子内部的机制，知之甚少，他们往往只能在对细节有限的了解基础上，对系统进行控制。但是合成生物学可没有这么简单，因此，工程师们的研究项目往往在面对生物的复杂性时受到阻碍。

如果我们能对生物系统的机制有更加深入的了解，那么合成生物学的发展一定会从中受益匪浅。这些进步已经引领我们研究了细胞内复杂的基因表达是如何有序运转的。合成生物学也是一门具有启示意义的生物学，帮助我们去了解某个基因产物是如何增强或抑制其自身的表达，从而使细胞在不同的稳定状态中进行

转换的。此外，还有许多未知的机制等待我们去挖掘和发现。

在过去的十年间，许多工程师开始对“做一些跟生物学相关的设计”产生兴趣。尽管生物学家并未因此感受到压力，觉得自己也必须去“做一些工程师做的事”，但是不可否认的是，生物学家和工程师的确应该开始合作，并互相学习。我们必须克服文化差异和偏见，不能以蔑视、狭隘的观念发表诸如此类的言论“嗯，她可不是什么生物学家”或者“那根本不算是工程学”等。当然，这需要时间、超越以及重新训练。我们要相信，这样做是会有回报的，我们会获得更加有意义的成果，无论是基础生物学还是生物技术领域。



合成生物学身归何处？

Mary Maxon，劳伦斯伯克利国家实验室生物科学战略规划和发展主任

美国的研究者、管理者、消费者以及批评者们对于合成生物学在学科领域中的位置难以取得一致的意见，有些人认为它是工程学的一个新的分支，也有人认为它是生物技术的一个延伸。对于遗传学家Craig Venter创造出人造生命，是否依托的是一门叫做“合成生物学”的学科，人们产生了颇多争论，有人认为“合

成生物学”不过是遗传工程的另外一个名字罢了。由于对“合成生物学”模棱两可的界定，使得科学家之间的讨论更加困难，这也阻碍了政策制定者以及对该领域提供基金支持者的步伐，有益于建立公众信心的管理规则的制定也因此受阻。

事实证明，那些界定更明确的新兴学科或技术更容易获得政府支持，无论是资金上还是在政策上。例如，由国会于1991年创立的网络和信息技术研究与发展项目（Networking and Information Technology Research and Development programme）在2015年将获得38亿美元的基金支持，创立于2001年的国家纳米技术计划（National Nanotechnology Initiative）拿到了15亿美元的资金支持。

目前，联邦政府已经开始对合成生物领域产生兴趣。在其国家生物经济蓝图（National Bioeconomy Blueprint）中，奥巴马政府将合成生物学看作是可将科技进步转化成经济效益的几项技术之一，应用领域覆盖健康、能源、环境和食品。2013年11月，国会曾要求美国化学学会（American Chemical Society）提供简报，介绍合成生物学对促进经济及人类健康发展的潜力，这一问题曾在2012年政府预算案中被问及，美国能源部提交了对此进行评估的计划。

如果我们不能对合成生物学的定义进行清晰的界定，就很难制定合理的政策。如果合成生物学和生物技术是一回事，那么它就应该被其它项目支持，而不需要政府出面进行大范围的协调工作。但是，如果正如2013年3月做的调查所显示的，合成生物学被公众理解成“非自然的、人工的、人造的”，因此在产生效益的同时，也会面临相当多的风险，国会也不大可能给予支持（详见go.nature.com/xlkfmk）。

美国科学家可以向英国合成生物学路线协调小组学习一些经验，该小组在2012年7月发表了他们的报告（详见go.nature.com/yneivc）。那之后一年，UK科学部长正式宣

布将给予这一新兴领域6000万英镑（相当于1.01亿美金）的基金支持。

合成生物学的绿色潜能

Andy Ellington, 德克萨斯大学奥斯汀分校生物化学教授

合成生物学面临的最大的挑战是如何超越之前那些仅仅集中于单个产物、有机体及生物学过程的研究。眼下，大部分应用都是类似于此的：对细菌进行人工改造，使其利用葡萄糖进行合成，产生生物燃料或者精制化学品，如香草素或青蒿素等。如果合成生物学能够覆盖更加广泛的领域，那么就有可能推动绿色经济的进展，让更多的有机体能够合成更多的化学品。

化工业是具有惊人效率的行业，不断将石油等原材料转化成更多种类的产品，例如塑料、医药品等。之所以可以如此高效地运转，有一部分原因在于原材料之间可以实现大规模的互相转化，在此过程中的催化剂及作用路径都经历了数十年的优化。

合成生物学同样也可以开启大规模使用碳资源的篇章，从木质纤维素到煤炭都可以加以利用。合成生物学家由此可以对生命的基本元素进行重新解读，利用原本并不丰富的中间产物，例如合成尼龙所需要的己二酸，己二酸可以用来合成抗生素。代谢工程学已经可以使用葡萄糖或其它标准碳资源作为前体进行合成了，但是共同培养合成修饰的有机体可以使这个过程更加高效。此外，对参与光合作用的有机体进行生物工程改造有可能使光照成为基本能量来源，而二氧化碳则作为基本碳资源来为人类所用。

若想把基因工程有机体引入化工业，需要有多样化的宿主，此外，也需要我们对新陈代谢和生态学有更加深入的了解。只有如此，才能够设计出能够大规模代替目前所使用的简单

糖类物质的微生物。对合成生物学领域进行规范和清晰界定的呼声已经出现。工业生产将依托于这个新成员将多样原材料和有机体通过新的化学方法联系在一起。

哺乳动物细胞的应用前景

Martin Fussenegger, 瑞士苏黎世联邦理工学院生物技术与生物工程教授

若想要合成生物学在医学上有所建树，需要更多更好的可以使用哺乳动物细胞的工具。目前用于细菌的标准工具对哺乳动物细胞而言是无用的或者说功能不足的。用于遗传工程改造的植物细胞面对同样的挑战。

在对细菌进行遗传工程处理中，研究者可以控制基因组片段的重组，或对DNA的大型片段（例如有利基因以及人造细菌染色体）进行改造，从而复制和执行新的遗传程序。对于哺乳动物细胞而言，获得大的DNA片段不是那么容易，使这些片段能够在细胞内正常发挥功能也很困难。大部分哺乳动物细胞包含两份其基因组的信息，基因组的表达部分受到表观遗传学的控制：DNA上的化学标记物以及其蛋白质产物。此外，哺乳动物细胞还含有其特有的结构：细胞器，能够在基因程序指导下对物质进行有序的组装，并在一定的时候使细胞发生凋亡。

这些都意味着哺乳动物细胞比细菌细胞要复杂得多。经过遗传工程处理，哺乳动物细胞可以执行一系列新陈代谢反应。这有点类似于残疾人所使用的假肢，人工介入获得的细胞内的反应通路也应该能够执行细胞的基本功能。将这种细胞植入人体内，它们便可以对人体血液内的疾病相关代谢产物进行监控，在必要时协调各部分产生并释放具有治疗作用的物质。在小鼠体内，这样的系统已经成功用于防止痛风及肥胖的发生。

较为理想的状态是，这些依靠遗传工程所

获得的细胞内反应通路可以根据机体需要，不断做出调整，从而克服口服药的缺点——针对不同需求的患者，却只能给予固定的剂量，对每个个体而言，剂量有可能过高或过低。为了使得设计细胞（**designer cell**）在正确的时间产生正确的量，研究者需要构建更好的DNA片段，并对它们进行合适的表观遗传标记，并保证在细胞分裂时，DNA和表观遗传修饰物都能够保持不变。而无论遗传学工具有多高级，单靠细菌是无论如何无法完成上述功能的。

合成生物学中的自动化高效设计

Ron Weiss, 麻省理工学院生物工程教授

当合成生物学家可以构建比过去更多的遗传组件时，如何进行更高效的设计则成为关键因素。在一个包含三个组件的系统内，可以通过实验将三个组件进行不同的组合，因此并不需要百分百完美的设计。但是如果一旦系统内的组件数目超过五个，对其进行彻底的实验检测就显得不那么现实了。如果不付出艰苦的努力，合成生物学就只能空对着一系列精妙的组件，却无法用有效的方法将其联系成为一个有机整体。

当计算机程序员编写一个软件应用时，他们并不会从头写每一行代码，也不会手动选择机器指令。他们会从已有的子程序和程序库中重新选择使用，然后利用计算机程序去选择特定机器指令。

合成生物学也需要类似的方法。为了达到这个目的，需要我们有更好的方法对不同环境下每个组件的性质进行研究和调整，例如当细胞生长时，需要怎样的功能路径等。此外，对这些组件的功能不能只局限在“启动”和“关闭”的范畴，而应该对各种活性状态有所了解（详见go.nature.com/hr8iu4），并确保设计工具能够将不同模块与部分整合在一起发挥功

能。有时需要我们把那些阻碍模块互相作用以及过度消耗细胞资源的部分隔离开来。

一个理想的设计工具应该能够掩藏看起来凌乱的内部构架，而使科学家能够专注于工作系统背后的逻辑关系，而不被其物质组成分散精力。例如，可以想象一下“生物编程程序”选择程序指令，将模块进行组合，并自动选择可以兼容的遗传组件。

从事这一领域研究的科学家们在每年一度的生物设计自动化国际研讨会（**International Workshop on Bio-Design Automation**）上相聚交流。每年都能够看到很多的研究成果，同时也让我们认识到还需要更多的努力，还有更多的进步等着我们去创造。

进化的力量

Herbert Sauro, 华盛顿大学生物工程副教授

应用于生命科学上的工程学和那些建筑行业或者计算机行业的工程学是完全不同的，因为生物处于进化的动态过程中。因此，很有可能出现这样一种情况：生物工程师日夜奋战设计出的方法，到了第二天就因为进化的自然选择而变成废纸一张。合成生物学家必须学会面对和解决这个问题。

理想的状态是，设计出的方法或工具应该尽可能长时间地保持有效。为了达到这个目的，我们可以小心处理DNA片段，使用对突变较不敏感的微生物菌株。我们甚至可以构建双重功能的DNA：从一个方向读取序列，它可以驱动遗传工程路径；如果从另一段读取，它则驱动某些基本功能。由于双重目的DNA中的突变会干扰细胞行使基本功能，因此要想使细胞存活，必须将遗传工程路径进行表达。

另一个策略则借鉴于大自然。早在人类工程师出现以前，细菌病毒λ噬菌体就已经具有尽可能长时间不被宿主发现的本事。病毒通过表达一种蛋白质对宿主进行巧妙监测，蛋白质

的表达量很低，因此不会影响细菌。当噬菌体检测到宿主出现某些健康问题时，它会启动一个相应程序，最终杀死细菌（并释放新的噬菌体颗粒）。生物工程师们可以向这种聪明的微生物学习，当细胞不能执行原有功能时，就杀死它们。

相反，如果遗传工程有机体到了实验室之外的地方，我们希望借由进化的力量消除它。我们可以给有机体装一个“死亡开关”或者加速其进化进程，使遗传工程通路在没有实验室特定条件支持下被消除。但如何在自然环境中

实现这些控制还没有被完全弄清楚。

想要对遗传工程系统的进化有深入了解，需要把原本看似没有关系的学科结合在一起，此外，那些负责拨款支持研究项目的机构也不应戴着有色眼镜来看待这个新兴领域。现在的现实可能是这样：工程师没时间去研究什么进化理论；另一方面，进化学家也对工程学不感兴趣。但无论如何，想要使合成生物学能够得到良性发展，就需要科学家们打破观念和知识壁垒，将不同学科结合在一起。

原文检索：

1. D. Ewen Cameron, Caleb J. Bashor and James J. Collins. (2014) A brief history of synthetic biology. *Nature Reviews*, 1-4.
2. Daniel G Gibson. Programming biological operating systems: genome design, assembly and activation. (2014). Daniel G Gibson. *Nature Methods*, 11:521-526.
3. James Attwater & Philipp Holliger. (2014) A synthetic approach to abiogenesis. *Nature Methods*, 11: 495-498.
4. Pamela A. Silver, Jeffrey C. Way, Frances H. Arnold & Joseph T. Meyerowitz. (2014) Engineering explored. *Nature*, 509:166-167.
5. Volker ter Meulen. (2014) Time to settle the synthetic controversy. *Nature*, 509: 135.
6. James J. Collins, Mary Maxon & Andy Ellington, et al. (2014) How best to build a cell. *Nature*, 509:155-157.



筱玥、EASON/编译



All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit

产品名称	货号	规格	目录价	优惠价
RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	E01010A	50 ml	¥ 800	¥ 640
All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit	AMRT-0020	25µl × 20 reactions	¥ 1,380	¥ 1,104
	AMRT-0050	25µl × 50 reactions	¥ 3,105	¥ 2,484
All-in-One™ miRNA qPCR Kit	AMPR-0200	20µl × 200 reactions	¥ 1,100	¥ 880
	AMPR-0600	20µl × 600 reactions	¥ 3,135	¥ 2,508
	AMPR-1200	20µl × 1200 reactions	¥ 5,940	¥ 4,752
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit	AOMD-Q020	20RT + 200 qPCR	¥ 2,380	¥ 1,904
	AOMD-Q050	50RT + 500 qPCR	¥ 5,680	¥ 4,544

All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit与miProfile™ miRNA qPCR arrays是基于SYBR GREEN I染料法的检测体系。该体系主要用于miRNA表达谱分析研究，还可用于芯片与测序结果的验证。

产品特性

灵敏度高 —— 能检测低至10pg小RNA或20pg总RNA中的miRNA；

宽广线性范围 —— 能同时检测不同表达水平的miRNA；

特异性高 —— 能区分miRNAs单碱基差异；

灵其PCR array具有批间批内重复性 —— $R^2 > 0.99$ ；

引物确证 —— 所有引物经过qPCR验证。

两步法：操作简便！节约成本！

All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit (Cat.

NO.AOMD-Q020, AOMD-Q050)将miRNA定量分为cDNA合成和PCR反应两步。

该试剂盒保证了两个步骤中的酶分别处于最佳反应温度，使反应效率最好。可保存逆转录合成的cDNA，以备多次使用，同时，一次逆转录反应所得的cDNA可用于检测多种miRNAs。

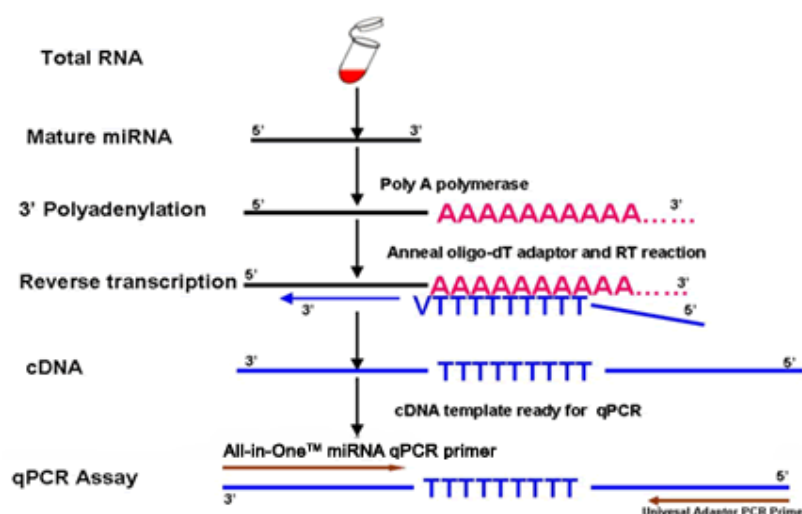


图4. 利用All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit定量miRNA的工作原理。

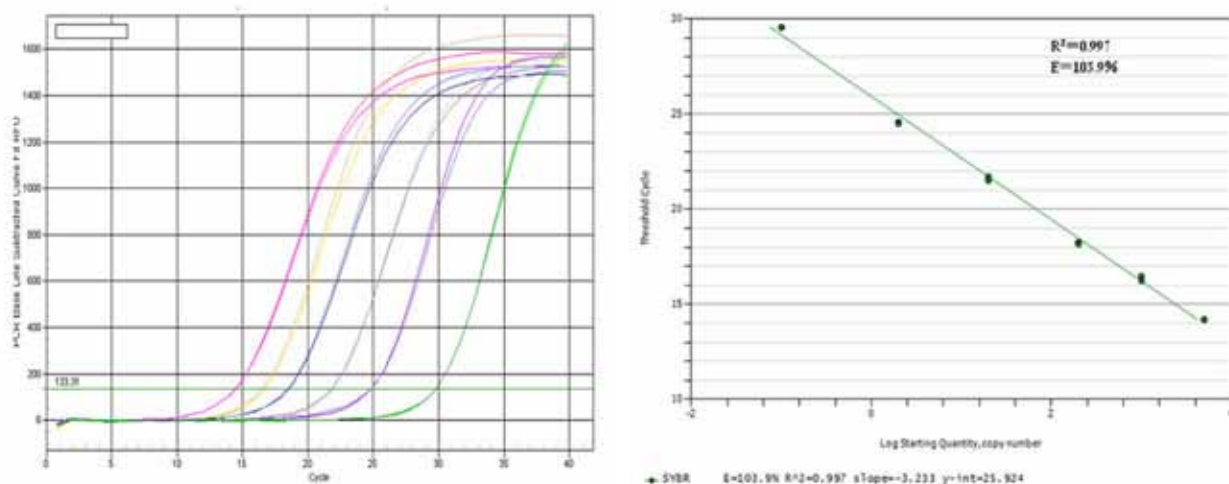


图5. 以不同量（5 µg、1 µg、200ng、20ng、2ng、100pg）的人脑总RNA为模板，利用All-in-One™ miRNA qPCR Detection Kit来检测hsa-miR-124的表达量。左图：扩增曲线；右图：标准曲线。结果显示，模板在5 µg~100pg的总RNA范围内得到了良好的线性扩增。

miRNA qPCR Array系列产品

产品名称	货号	规格	目录价	优惠价
All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (for qPCR array)	AMRT-2020	25µl × 20 reactions	¥ 1580	¥ 1,264
	AMRT-2050	25µl × 50 reactions	¥ 3,555	¥ 2,844
miProfile™ miRNome qPCR Arrays	Various	96-well or 384-well	Inquire	Inquire
miProfile™ cancer miRNA qPCR Arrays				
miProfile™ Disease and focus-group miRNA qPCR arrays				

miRNA ID	miRNA SEQ
hsa-let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
hsa-let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
hsa-let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7f	UGAGGUAGUAGAUAUGUAUAGUU
hsa-let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUUU
hsa-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU

表1. 以let-7a为参考，其它let系列miRNA与其比对后的碱基差异（以红色标记）

克隆let系列的miRNAs，各miRNA特异引物通过All-in-One™ miRNA Q-PCR detection Kit分别检测以10⁵分子数的miRNA质粒。以引物与miRNA完全匹配所得的Ct值为对照，各碱基有差异的miRNAs的Ct值与之相比，通过公式（相对分辨率 = 2^{-ΔCt} × 100%）即可得到miRNA qPCR Detection System的检测分辨率。表中标记为红色的为引物和miRNA序列完全匹配的检测分辨率。灰色的为单碱基差异的检测分辨率，黄色的为双碱基差异的分辨率，白色的为2个以上碱基差异的检测分辨率。

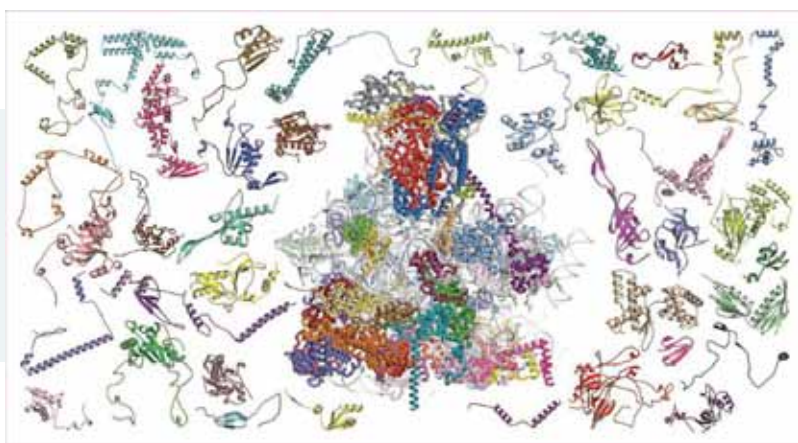
miRNA 质粒模板	miRNA qPCR Detection System的相对检测分辨率								
	All-in-One™ miRNA Q-PCR Primer								
	let-7a	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e	let-7f	let-7g	let-7i	miR-98
hsa-let-7a	100.00%	0.01%	0.33%	0.08%	3.21%	0.41%	0.00%	0.00%	0.00%
hsa-let-7b	0.00%	100.00%	0.42%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
hsa-let-7c	0.32%	2.05%	100.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
hsa-let-7d	8.97%	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
hsa-let-7e	1.51%	0.00%	0.01%	0.00%	100.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
hsa-let-7f	2.67%	0.00%	0.01%	0.00%	0.04%	100.00%	0.00%	0.00%	0.00%
hsa-let-7g	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	100.00%	0.00%	0.00%
hsa-let-7i	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	100.00%	0.00%
hsa-miR-98	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	100.00%

表2. 通过各miRNA特异引物分别检测人类let系列miRNAs

热点

Hot Topics

不再混沌



图中展示的就是构成酵母线粒体大核糖体亚单位 (yeast mitochondrial large ribosomal subunit) 的各个组成蛋白质。Amunts等人根据利用低温冷冻电镜技术获得的酵母线粒体大核糖体亚单位及完整核糖体的结构图谱，一个个地合成出了上述这些组分蛋白。这个经过不断完善的结果与根据X线晶体成像技术获得的原子模型非常吻合。

先进的低温冷冻电镜 (cryo-electron microscopy) 技术让我们获得了大量高分辨率的蛋白质结构图。

结构生物学 (**structural biology**) 研究的主要目的就是获得用于构成活体细胞的各种各样大分子 (**macro-molecules**) 生物组件的高分辨率图像信息。该研究主要依赖的技术手段就是X线晶体照相术 (**x-ray crystallography**) 以及核磁共振光谱分析检测技术 (**nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR spectroscopy**)。不过这两种技术都有各自的局限性, 比如X线晶体照相术只能对生长得极为有序的三维结晶进行观察, 而核磁共振光谱分析检测技术则要求被检测样品的纯度非常高, 不能够有重叠峰出现。有很多生物大分子相互结合、组装之后形成的都是非常大的, 或者非常不稳定、比较罕见的结构, 都不太适合用上述这两种技术进行分析和检测。单粒子电子显微镜技术 (**Single-particle electron microscopy, EM**) 则能够观察少量非结晶样品, 获得高分辨率的结构图谱。

使用单粒子电子显微镜技术可以获得任意排列方向的分子复合体 (**molecular complexes**) 的结构图像。该技术会从每一幅图像中选出单个的复合体 (粒子), 然后借助计算机来判断它们的排列方向。最后将各个不同视角的图像组合在一起, 得到该分子的三维立体图像。不过由于高能电子束会对生物大分子起到破坏作用, 打断分子内的共价键 (**covalent bonds**), 并且诱发一系列级联式的有害化学反应, 所以这种放射性损伤效应给单粒子电子显微镜技术带来了极大的局限性, 在实验时用来记录影像的电子束的能量受到了非常大的约束。

20世纪80年代, Dubochet等人报道了一种单粒子电子显微镜技术革新成果, 将该技术引向了高分辨率成像之路。他们在低温条件 (**cryogenic conditions**) 下将待检样品放在一层薄薄的、透明的冰上用单粒子电子显微镜进行成像观察。这种方法就是所谓的“低温冷冻电镜技术 (**cryo-electron microscopy, cryo-EM**)”, 他能够对含水的粒子 (**hydrated particles**) 进行直接成像。

低温除了具有这些优势之外, 还能够减少电子束对样品产生的放射性损害。不过电子束的照射量还是不能够太大, 只有这样才能够清晰地反映出分子结构的细节, 获得高质量的、低信噪比 (**signal-to-noise ratio, SNR**) 的三维结构图像。由于将每个分子的多张图像信息组合在一起能够更进一步地降低图像的信噪比, 所以, 对数万、乃至数百万个蛋白质复合体进行分析就会产生数十万张图像。

不过依靠低温冷冻电镜图像来判断生物大分子的结构给计算机处理分析工作带来了一大挑战。在借助多图像组合平均手段来改善信噪比时, 必须知道每一颗粒子的方向, 但是由于信噪比太低, 我们对这些粒子方向的判断又明显感觉准确性不够, 这就形成了一个矛盾。要解决这个问题, 最成功的方法就是“重复 (**iterative**)”, 质量高的图像能够给出更准确的方向信息, 而这些方向信息又可以帮助我们获得更高质量的图像。

直到最近这一段时间, 绝大部分单粒子低温冷冻电镜图片的分辨率都非常低, 连10埃都达不到, 所以很多人都将这种技术嘲笑为“一团浆糊学 (**blob-ology**)”。蛋白质二级结构中的 α 螺旋 (**α helices**) 结构只有在分辨率达到9~10埃, 甚至更高分辨率的情况下才能够看清; 而另外一种二级结构, β 折叠 (**β strands**) 结构则只有在分辨率达到4.8埃以上时才能够看清。达到3.5埃的分辨率, 就可以为蛋白质或核酸等生物大分子构建原子模型 (**atomic models**), 将各种目前已知的核酸结构或氨基酸结构填入其中了。如果要想了解蛋白质复合体形成时发生的各种化学变化, 就必须获得原子级别分辨率的细节信息。低分辨率的结构信息也不是一无是处, 当在与高分辨率结晶图像相互配合、印证, 用来判断组成复合体的各种不同组分时更加有意义。因此, 即便分辨率较低, 低温冷冻电镜技术也还是帮助科学家们解决了很多生物学难题, 比如解析出了与其他辅因子共同结合的核糖体的结构问题, 以及构象只能够维持片刻时间的核糖体瞬

时结构等问题。

在过去的三十年，低温冷冻电镜设备取得了长足的进展，在样品制备、成像、计算机处理等实验技术方面有了一定的提升，这些使低温冷冻电镜成像技术的分辨率有了极大的提高。高度连贯的场发射电子枪（**Highly coherent field-emission electron guns**）也使保留焦点以外的图像的高分辨率信息成为可能，这对于单粒子低温冷冻电镜非常有帮助。这种技术创新帮助科研人员获得了20面体病毒粒子（**icosahedral virus particles**）的图像，而且清楚地看到了其中的 α 螺旋结构。由于这种病毒是高度对称的，所以比较容易生成高质量的、最佳分辨率的低温冷冻电镜图像。

随着研究人员不断地开发出更稳定的载物台、更好的显微镜抽真空技术，以及自动化的数据采集系统，这一切的技术进步都让我们能够获得更多、质量更好的电镜图像，因此才能够得到高质量的、能够对其中的氨基酸侧链进行解析的二十面体病毒粒子三维结构图像，以及分辨率达到5埃的核糖体结构图像。不过在对更小一点的非对称粒子的解析工作中还是很难解析到 α 螺旋结构。

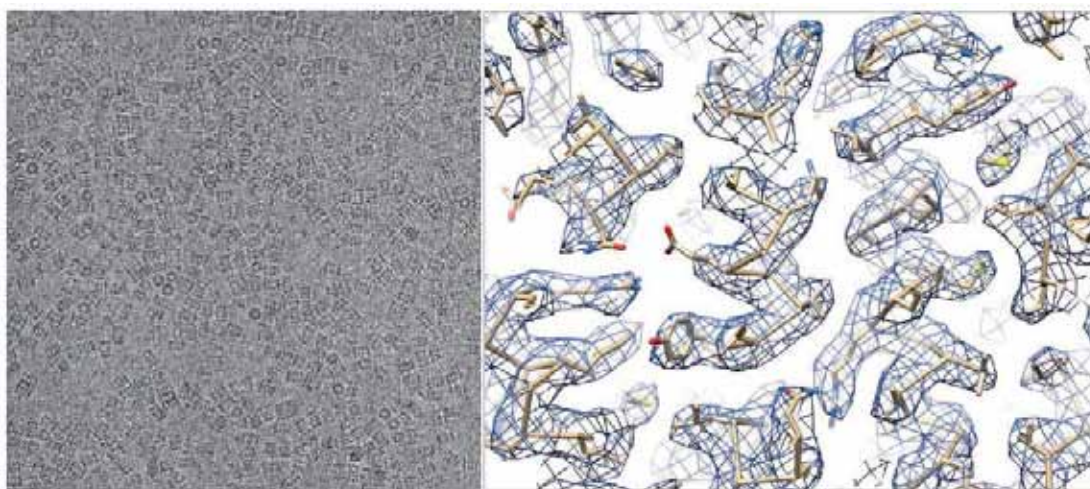
最近在低温冷冻电镜设备领域取得的最大进展就是引入了直接检测设备（**direct detector device, DDD**）照相机。这种DDD设备能够直接在传感器上记录图像，从而绕过了传统的、需要闪烁设备和光纤的电荷耦合装置（**charge-coupled device, CCD**）探测器，以及其他一些在用摄影胶片（**photographic film**）记录图像时必须经过的繁杂的处理过程。因此，图像的信噪比也得到了极大的提

升。在分辨率方面的提升也与之前的一些革新手段相当。在使用了DDD设备之后，还有可能在电镜图像中直接构建原子模型，甚至能够在最具挑战性的检测工作中进行 α 螺旋和 β 折叠的解析工作。

DDD设备的引入还在另外一个方面对低温冷冻电镜的图像起到了改善作用，凭借的就是该设备极快的读出速度（**readout rate**），该读出速度能够发现被冰包裹的被观测粒子在电子束中的运动情况。使用DDD设备不仅能够发现这种问题，还能够解决这种问题，因为现在的电镜就好像是一台摄像机，可以拍摄一段录影，记录整个过程，而不再像以前那样，只是一台照相机，只能够拍摄出一张张固定的图像。

有了高质量的图像，又有可以借助计算机对因为电子束而移位的粒子进行校正的工具，我们就可以获得大量高质量的低温冷冻电镜图像，比如本文开头展示的那张分辨率高达3.2埃的线粒体核糖体亚单位图像，以及下图那张分辨率达到3.3埃的20S蛋白酶体图像和哺乳动物感受器通道TRPV1的图像。TRPV1的图像尤其值得一提，因为TRPV1蛋白是一种膜蛋白，只有四级对称性（**four-fold symmetry**），比核糖体要小一个数量级。所以之前大家一直都认为很难用低温冷冻电镜对该蛋白进行结构解析的研究工作。有了DDD成像技术、更好的计算机辅助和生物化学技术之后，Liao等人终于在某些区域获得了分辨率高达3.4埃的图像，从而有机会开展原子建模工作，在整个结构生物学（**structural biology**）发展历史上写下了重重的一笔。





单粒子低温冷冻电镜结构解析图。左图展示的是随机排列的蛋白质粒子在电镜下的图像，这些图像经过计算机处理之后可以用来计算大分子复合物的三维立体结构图像。由于有了DDD技术，左边的这些图像信息就可以构建出右图中展示的原子模型。图中展示的就是20S蛋白酶体的结构图。

乍一看上去，这些成果都好像是特例。比如核糖体里由于含有大量的RNA，所以是一幅高度紧缩的图像，非常紧密，不太容易受到辐射的损失。而20S蛋白酶体拥有14级对称性，所以也非常适于进行低温冷冻电镜成像操作。即便是TRPV1通道蛋白也都拥有一定的内部对称性。但是最近刚刚成功获得的一幅电镜图像就完全不具备上述这些“先天优势”，这就是分辨率达到4.5埃的人 γ 分泌酶复合物（ γ -secretase）的结构图。人 γ 分泌酶复合物是一种更小的膜蛋白复合体，完全没有对称性。该成果说明，只要待测样品能够准备得恰当，尽可能减少其在结构上的异质性，我们就完全有可能利用低温冷冻电镜技术获得各种蛋白质的三维立体结构图。

这些科研新进展恰好出现在低温冷冻电镜技术的低谷期。最近刚刚获得的HIV-1病毒糖蛋白三聚体结构模型就引起了极大的争议，因为多位电镜专家都坚持认为，这个结构模型不仅在结构上不准确，就连用来进行分析的原始图像也都没有真实地反映该三聚体的真实信息。这场争论也让我们意识到，我们目前的确

没有太多的手段对低温冷冻电镜图像的质量进行验证，虽然有一些手段，但是都没有得到广泛的推广和应用，另外也缺乏一套规范，图像的信号非常差，所以也很难判断最终得出的结构图是否就是被测样品的结构。这是一个非常值得关注的问题，不仅仅是因为这次的HIV-1病毒糖蛋白三聚体结构模型具有重大的科研价值，比如在HIV疫苗的开发工作中会起到非常重要的指导作用等。

在结构解析方面还有大量的工作需要我们去完善：方便使用的显微镜相板（phase plates）有助于更好地聚焦，获得高对比度的图像，就好像相衬光学显微镜（phase-contrast light microscopy）那样，这能够让对图像进行信息采集的工作更加简便，而且质量更高。另外在探测器方面也可以进一步提高图像的质量。即便是最先进的探测器也达不到合理理论要求的表现。各种用来进行图像分析的计算机软件，比如用来矫正电子束相关移位的软件，或者对各种粒子进行分类、解读的软件也将会变得越来越强大。新型的样品承载系统会进一步减少电子束对样品的位移作用。更

加可靠的、更加强大的验证工具可以让我们更有信心，保证不会纳入质量不高的原始图片素材。虽然现在还不知道低温冷冻电镜技术未来

会走向何方，但是有一点是可以肯定的，那就是低温冷冻电镜图像绝对不再是一团浆糊了。

原文检索：

Martin T. J. & John L. Rubinstein. (2014) Beyond blob-ology. *Science*, 345:617-619.



EASON/编译

百态

Amazing Lives

海藻能为喉盘鱼节省吸力



北方喉盘鱼（Northern clingfish, *Gobiesox maeandricus*）。

在潮水之间的地带，波浪不断地冲刷着所有定居的生物，生活是艰难的。于是，在

那儿，一些居民群聚在各种洞穴缝隙中以求庇护，而其它生物就只能将身体附着在岩石

上，得以在波涛汹涌中安顿生存。北方喉盘鱼（*Gobiesox maeandricus*）就是后者，它们利用腹部的吸盘吸附于岩石之上。“喉盘鱼拥有能够吸附在各种粗糙物体表面的惊人能力。”——这是Petra Ditsche的原话，他来自美国华盛顿大学（University of Washington）。值得注意的是，海岸的岩石由于常常受到冲刷，极少仍保持原始状态，通常是覆盖着厚厚的一层滑溜溜的微生物以及海藻。正因为如此，Ditsche及其同事Dylan Wainwright和Adam Summers不禁想，这些黏糊滑溜的外层会如何影响喉盘鱼的吸附力呢？嗯，的确是一个有意思的问题。

不过，在对喉盘鱼的吸附力进行测试之前，三位研究者还需要制造出一堆与海中岩石表面粗糙度一致的物体，而且粒径的变动范围从泥沙级别到细砂砾不等。于是，Ditsche想到了砂纸，她解释说，在此前的研究中，他们已经用过砂纸作模。并且，在同一物质上铸模能够消除物质特性的差异。而当Ditsche在测试中用完了同一批次的砂纸后，接着使用不同级别的物质（从细砂砾到硬纸板）来制造最为粗糙的岩石模型。然后，她将每种表面的批量模拟样品悬吊在星期五港实验室（Friday Harbor Laboratories）的海里；大约6周后，这些模拟品的表面覆盖了海藻及其它微生物。这样，就可以测试它们对具有吸附力的小喉盘鱼产生的影响了。

Ditsche回到实验室，与Wainwright共同工作，测量将体重范围为1.5-15g的喉盘鱼从清洁表面拉开所需要的力。结果发现，与具有细砂砾的表面相比，鱼儿较难粘附在光滑表面

上。而且，在物体表面粒径从500-1000 μm 增至1000-2000 μm 时，它们遭受到了最大的吸附困难。当然，体型最大的鱼比最小的要好一些，最小的鱼根本无法吸附在表面粒径大于1000 μm 的物体上。此外，他们还发现，吸盘小的鱼儿（直径上限为13mm）无法吸附在表面粒径大于269 μm 的粗糙物体上，而体型较大的鱼（吸盘直径34mm）则能够将自己紧紧地固定在最为粗糙的物体表面上。

接着，研究小组测试了粘性覆盖物对喉盘鱼吸附力的影响，结果是令人惊讶的：鱼儿能够以强大的吸力（最大为14-15N）附着于布满海藻等物体的各种光滑表面和粗糙表面上，这个吸力是鱼儿体重的150倍！有意思的是，尽管所有体型的喉盘鱼都仍然能够吸附在布满海藻等生物层的物体表面上，但是它们自身产生的吸力却减少了，即海藻等生物层能够影响鱼儿在不同表面付出的吸力：喉盘鱼对粒径最小的表面的粘附力下降超过20%，而使鱼体附着于269 μm 粒径的表面的吸力则只下降了6%。

根据上述试验，研究小组考查了生长在测试模型表面的微生物和海藻层的物质特性，提出微生物膜的薄层部分在鱼体和所附岩石停留地带之间能够起到润滑的作用，即通过阻止排布在吸盘周围的细毛锁住岩石表面的方法，减少吸盘和岩石之间的摩擦力。Ditsche表示，生物膜或者其它附着水生生物在原始物体表面的生长，能对水生动物的吸附力产生显著的影响。因此，一般来说，在研究水生动物的吸附力时，还需要考虑海藻等附着生物对它们的影响。

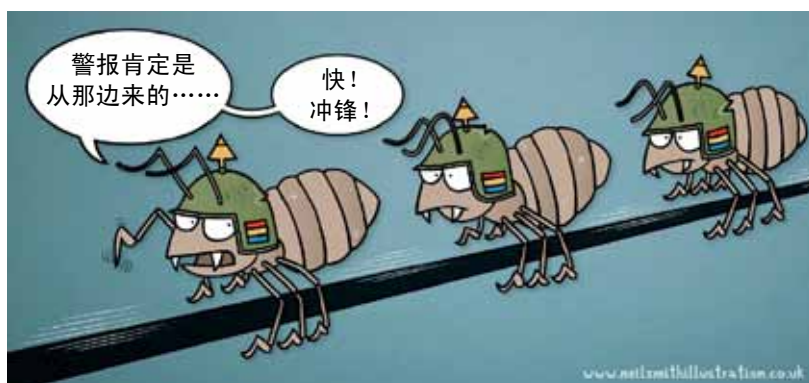
原文检索：

Ditsche, P., Wainwright, D. K. and Summers, A. P. (2014). Attachment to challenging substrates - fouling, roughness and limits of adhesion in the northern clingfish (*Gobiesox maeandricus*). *J. Exp. Biol.* 217, 2548-2554.



文佳/编译

白蚁通过感知超短时差的抵足震动来获得警报



要是你能够看到白蚁的兵蚁在土巢遭受攻击时的样子，肯定会觉得它们的通讯方式不同寻常：这帮铁头兵用加强版的脑袋猛击地面，以此向同伴发出警报。我们暂且不去探讨它们为何喜欢以这种方式来使用脑袋，先来看看这些接收者：它们是怎么收到同伴发来的“磕头短信”的呢？德国波鸿鲁尔大学（Ruhr University Bochum）的Felix Hager解释说，白蚁是用足上的震动感知器官（又称听觉性器官）来探测出警报信号的。然而，它们的神经系统是否足够敏感，能够探测到抵达每一条足的震动之间的极其微小的延时，从而使它们感知到声源来自于哪个方向呢？这一点人们原先并不清楚。对此，Hager及其同事Wolfgang Kirchner表示，在纳塔尔大白蚁（*Macrotermes natalensis*）的窝巢，震动警报信号以 130ms^{-1} 的速度传播，这意味着它们必须能够探测出到达每一条足的震动（每次震动时差在 0.2ms 之内）。那么，这个猜测有可能发生吗？

原文检索：

Hager, F. A. and Kirchner, W. H. (2014). Directional vibration sensing in the termite *Macrotermes natalensis*. *J. Exp. Biol.* 217, 2526–2530.

首先，两位研究者分别测试了白蚁的兵蚁和工蚁对模拟警报震动产生的反应，结果证实：当兵蚁转去进攻时，工蚁逃跑了。这说明两者都能接收到警报。接着，他们测试白蚁能够分辨的抵达不同足的震动时差有多少。这要怎么测试呢？首先，研究者设置了两个相隔 1mm 宽度的PVC平台，然后将它们分别与一个扬声器相连，制造出警报信号震动。随后，他们将五只兵蚁放在平台上，使它们的足横跨于平台之间的缺口。接着在第二个平台发生震动不到一毫秒之后，再震动第一个平台。

两位研究者按照上述试验方法，将延迟震动的时间差进行改变，范围为 0.29 至 0.09ms ，结果他们惊奇地发现：兵蚁向第一个震动的平台进军，正如它们所面临的是实战攻击一样。而且，白蚁能够探测出时差仅为 0.2ms 的抵足震动。所以，白蚁的神经系统是敏感的，足以使它们对超短时差的抵足震动产生反应，因此，它们在面临攻击事件时，能迅速作出如何应对的决定。



文佳/编译

A group of people are standing on their hands, forming a human pyramid. The person at the top is reaching out with one arm. The background is a bright, cloudy sky. The text is overlaid in the center of the image.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255

www.LifeOmicS.com
www.LifeOmicS.com