中国合成生物学发展回顾与展望

张先恩^{1,2*}

1. 中国科学院生物物理研究所, 中国科学院生物大分子科教融合卓越创新中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: zhangxe@ibp.ac.cn

收稿日期: 2019-12-04; 接受日期: 2019-12-12; 网络版发表日期: 2019-12-16

摘要 合成生物学既是一门“汇聚”型新兴学科, 又孕育着颠覆性的使能技术. 它在系统生物学基础上, 融汇工程科学原理, 采用自下而上的策略, 重编改造天然的或设计合成新的生物体系, 以揭示生命规律和构筑新一代生物工程体系, 被喻为认识生命的钥匙(建物致知)、改变未来的颠覆性技术(建物致用). 中国科学家曾经首次实现人工合成蛋白质(牛胰岛素)和核糖核酸(酵母丙氨酸tRNA), 近年来又在染色体合成与染色体工程、基因组编辑、生物底盘构建、定量工程生物学、生物元件工程和基因回路工程、天然活性物质和有机化工产品的人工合成代谢、计算机生物模拟等方面取得系列原始发现和创新成果, 成为国际合成生物学领域中的一支重要力量. 时值新中国科技发展70年, 撰写本文, 从一个视角讨论合成生物学发展及中国科学界的贡献, 纪念开拓者, 励志来者, 总结经验, 梳理发展思路. 期待中国合成生物学繁荣发展, 更多地贡献于人类.

关键词 合成生物学, 染色体工程, 基因组编辑, 定量工程生物学, 底盘细胞, 生物元件, 基因回路, 合成代谢, 使能技术, 生物伦理

19世纪下半叶以来, 生命科学研究领域每50年左右便竖起一座里程碑, 包括孟德尔遗传定律(1886年)、摩尔根的染色体遗传学说(1909~1928年)、沃森和克里克构建的DNA双螺旋结构模型(1953年)以及人类基因组计划(1990~2003年). 人类基因组计划的完成推动生命科学进入组学(~omics)和系统生物学时代. 而系统生物学与基因技术、工程科学、合成化学、计算机科学等众多学科交叉融合, 又催生和振兴了合成生物学. 作为一门典型的新兴和汇聚科学领域, 合成生物学的影响力在21世纪以来迅速上升. 它被喻为认识生命的钥匙、改变未来的颠覆性技术. 中国在合成生物学发展中扮演着重要角色, 本文从一个角度进行

扼要综述及展望.

1 缘起和早期实践

1.1 人工细胞与细胞重建

100多年前, 关于生命的机制有两种主要的观点. 生命论或活力论(Vitalism)主张, 生命体与非生命体有本质的区别, 它不受自然法则支配, 或受不同于非生命体的原理支配. 反对观点却认为, 活力论(对于生命机制)什么也解释不了, 生命现象也源于寻常的化学和物理原理. 一位代表人物是法国学者Stéphane Leduc (1853~1939年). 他通过溶液和溶质渗透和扩散方法模

引用格式: 张先恩. 中国合成生物学发展回顾与展望. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1543–1572

Zhang X E. Synthetic biology in China: Review and prospects (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 1543–1572, doi: 10.1360/SSV-2019-0299

拟了人工合成细胞及其次生细胞群(人工桑椹胚)、营养与人工丝状真菌发育,并用矿物质等模拟了生物特有的趋光性、趋化性和趋电性.这些研究结果总结在他的几本法语专论中,内容概括为:生物学仅仅是流体物理学的一个子集,物质的物理学机制可能导致生命的出现.1913年,一位署名W.A.D.的作者在*Nature*期刊以“合成生物学与生命的机制”为题,系统评述了他的研究^[1].合成生物学(syntheticbiology)这个词便出现在那个时期.

1932年,生物物理学家贝时璋(1903~2009年)^[2,3]在研究南京丰年虫中间性生殖细胞的性转变时观察到:卵母细胞中新形成的细胞并不是由母细胞分裂而来,而是以母细胞细胞质中的卵黄颗粒为基础材料(后发现其中含有核酸),经由自组装过程逐渐形成,即细胞重建过程.经过进一步研究和取证,他提出了细胞重建学说.多年后总结为:细胞重建现象是一个自组织的过程,只要具备物质基础和合适的环境,在生物体内或在离体培养的情况下,都有可能发生细胞重建和核重建^[4-6].这虽有悖于细胞是以分裂方式繁殖增生的生物学知识,但支持者认为,细胞重建学说有助于研究地球上细胞的起源,即便是特殊条件下发生的事件.

1.2 生命机制的物理学

早期从物理学和化学角度对生命机制的探讨,被薛定谔(Erwin Schrödinger, 1887~1961年)在《什么是生命?》^[7]一书中精辟总结和阐述.作为一位量子物理学家,他以数理科学的逻辑和简洁,将当时生命科学已有的知识(遗传、变异、细胞学过程等)层层展开,与机械力学、热力学、统计力学及量子力学等物理学定律关联.论述极具启发性,激励了大批年轻的物理学家和化学家与生物学家合作,研究生物体系结构、功能与机制,这包括后来物理学家与生物化学家联合发现DNA双螺旋结构^[8],该发现极大地推动了生命科学发展.

1.3 中国科学家首次人工合成蛋白质-牛胰岛素

同期,蛋白质化学研究也获得长足发展.其中,胰岛素的发现(<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1923/summary/>)、首次合成多肽(催产素)^[9,10]、蛋白质(牛胰岛素)测序^[11-13]分别于1923年、1955年和1958年获得诺贝尔奖.

基于这些进展,1958年,中国科学院(以下简称“中科院”)上海生物化学研究所提出了“世界上第一次用人工方法合成的蛋白质在中华人民共和国实现”的目标.据多篇纪念性文献和现中科院上海生物化学与细胞生物研究所展览室的资料,当时的选题思想是:蛋白质是生命的物质基础之一;胰岛素是最先知道其一级结构的一种最小的蛋白质;蛋白质和多肽链的主要不同之处,在于它除了具有一定的一级结构以外还有特殊的空间构型.合成胰岛素的主要困难包括:(i)必须将胰岛素分子中的3个二硫键拆开,再看能否重新合成胰岛素;(ii)即使可行,要合成21肽及30肽,远超当时合成13肽的国际水平;(iii)合成工作需要大量的氨基酸试剂,尚不能自给;(iv)蛋白质和多肽的分离分析技术尚待建立.在国家的支持下,由中科院上海生物化学研究所、上海有机化学研究所和北京大学3个单位联合组成协作组,开始探索用化学方法合成胰岛素.经过数年协同攻关,克服重重困难,于1965年完成了牛胰岛素的全合成.鉴定显示,它的结构、生物学活力、物理化学性质、结晶形状都和天然的牛胰岛素完全一样^[14-16].这是世界上第一个人工合成的蛋白质,为人类认识生命、揭开生命奥秘迈出了一大步.成果获1982年国家自然科学一等奖,是新中国科技史上重要的标志性成果之一.英国的桑格博士对此特别兴奋,“你们合成了胰岛素,也解除了我思想上的一个负担.”原来,有人对他1955年测定的胰岛素一级结构的部分序列表示怀疑^[17].

1.4 中国科学家首次人工合成核糖核酸-酵母丙氨酸tRNA

相对于蛋白质和多肽的化学合成,核酸合成化学发展较晚.1966年,美国Har Gobind Khorana等人^[18]率先合成了多聚核苷酸,并因其对阐释遗传密码的贡献而分享了1968年的诺贝尔生理或医学奖.受此启发和人工合成胰岛素成功的激励,1967年,中科院一批青年学者开始讨论“人工合成核酸”的问题.1968年,中科院批准立项,由中科院上海生物化学研究所、中科院上海细胞生物研究所、中科院上海有机化学研究所、中科院生物物理研究所、北京大学和上海试剂二厂共同承担,历时约13年(中间曾中断),于1981年用化学和酶促合成相结合的方法全合成了酵母丙氨酸tRNA.它由76个核苷酸组成,其中包括天然分子中的

全部修饰成分,产物具有与天然分子相似的生物活性^[19,20]。这是首次人工合成的具有生物学功能的核糖核酸,也由中国人完成。这项标志性成果于1987年获得国家自然科学奖一等奖。

结晶牛胰岛素和酵母丙氨酸tRNA的全合成,是合成化学与生命科学的汇聚成果,也是我国合成生物学的早期实践,为后来人工合成基因组积累了重要经验。

2 新世纪合成生物学

2.1 重新定义合成生物学

DNA双螺旋结构的发现、遗传密码的破译、限制性内切酶的发现、PCR技术的发明等一系列重大分子生物学成就,催生了基因工程技术。德国学者Hobom^[21]称“基因手术正在开启合成生物学的大门”。2000年,在美国化学学会年会上,斯坦福大学Kool指出,当前许多研究人员,包括他本人,正在利用有机化学和生物化学的合成能力,设计出在生物系统中发挥作用的非天然合成分子。他将之定义为“合成生物学”^[22]。还有学者将合成生物学描述为“利用工程学的设计和构建原理来开发、进化生物组件和系统,并使其标准化”^[23]。后来,英国工程和物理科学研究委员会(The Engineering and Physical Sciences Research Council, EPSRC)写道:“合成生物学是指针对应用目的,对以生物为基础的元件、器件和系统以及对现有天然生物系统的重新设计和工程化”^[24]。

如今,对合成生物学的定义已经有许多类似的表述,但其内涵已与原初概念大相径庭。百年前提出的合成生物学,是指利用物理和化学方法合成类生物体系来模拟生命过程,了解生命机制。而现代版定义则是指利用基因技术和工程学概念来重新设计和合成新的生物体系或改造已有的生物体系。

中国科学家用中文对合成生物学作了精辟的概括:“造物致知,造物致用”或“建物致知,建物致用”^[25-29]。可解读为,通过建造生物体系而了解生命,通过创造生物体系来服务人类,前者也能更好地促进后者。因此,合成生物学在生命科学和生物技术两个方面都具有重要意义。

合成生物学引入工程学理念,强调生命物质的标准化,对基因及其所编码的蛋白表述为生物元件(bio-

logical parts)或生物积木(biobricks),对元件所做的优化、改造或重新设计称为“元件工程”;由元件构成的具有特定生物学功能的装置称为“生物器件”或“生物装置”(biodevices);对基因元件组成的代谢或调控通路表述为基因回路(gene circuit),或基因电路、基因线路(本文统一表述为基因回路);对除掉非必需基因的基因组和细胞表述为简约基因组(minimal genome)和简约细胞(minimal cell);结合简约基因组或模式生物、进行功能再设计和优化所获得的细胞称为底盘细胞(chassis cell)等。

2.2 系列颠覆性创新开创生命科学新纪元

合成生物学真正被广泛关注始于21世纪初,后来产生的一系列颠覆性成果连续入选*Science*期刊年度十大科学突破。

2000年,波士顿大学Collins团队^[30]受噬菌体 λ 开关和蓝藻昼夜节律振荡器的启发,设计合成了双稳态基因网络开关;普林斯顿大学Elowitz和Leibler^[31]基于负反馈调控原理设计了基因振荡网络。这些人工生物器件和回路都在大肠杆菌细胞中实现,为基因组编辑及人工基因网络调控提供了设计思想,是合成生物学的经典之作。

2002年,纽约州立大学石溪市分校Wimmer团队^[32]通过化学合成病毒基因组获得了具有感染性的脊髓灰质炎病毒。这是首个人工合成的生命体,该文作者说,“通过把这一结论公布于众,你们能警示当局……告诉他们生物恐怖主义者都能做些什么。”

2010年,美国Venter团队^[33]宣布首个“人工合成基因组细胞”诞生。他的团队设计、合成和组装了1.08 Mb的支原体基因组(JCVI-syn1.0),并将其移植到山羊支原体受体细胞中,产生了仅由合成染色体控制的新支原体细胞。新细胞具有预期的表型特性,并能持续自我复制,被命名为“Synthia”,意为人造儿。研究人员在基因组中设计了基因缺失和多态性,并留下“水印”(footprints)——包括46名科学家和研究员的名字、Venter研究所的网址,以及爱尔兰作家Joyce的名句“生存、犯错、倒下、战胜,用生命创造生命”。这是首次成功合成原核生物基因组及细胞,研究结果入选*Science*期刊评选的2010年度十大科学突破。

2012年,美国约翰霍普金斯大学的Jef Boeke(现纽约大学)开始领导酵母染色体人工版本(Sc2.0)的合成,

这是首次挑战真核细胞基因组的合成，中国学者在其中扮演了重要的角色(将在后文中介绍)。就此，人工合成基因组生物涵盖了病毒、原核生物和真核生物，预定特性的人造细胞已悄然实现，这是生命体系从自然发生到人工产生的一个转折点。目前，科学家已经开始向合成多细胞生物基因组发起挑战。

2014年，拓展遗传密码子入选*Science*年度十大科学突破。美国Scripps研究所Romesberg团队^[34]设计合成了一个非天然碱基配对：X和Y，并将它们整合到大肠杆菌基因组。理论上，遗传字母表从4个变成6个，密码子可以从64个扩充到216个，这意味着在控制条件下，未来的生命形式有无限种可能。遗传学和合成生物学专家George Church说，这是“人类探索生命基石的里程碑事件”。3年后，Romesberg团队^[35]又成功地让含非天然碱基dNaM-dTPT3配对的DNA在大肠杆菌中实现转录和翻译，并使非天然氨基酸在绿色荧光蛋白中定位结合。*Nature*期刊评述：“外星(Alien)”DNA在活细胞中制造蛋白质(Ewen Callaway, *Nature*, 2017)。

2016年，新“蛋白设计”入选*Science*期刊年度十大科学突破。计算生物学家在精确预测蛋白质折叠方式方面取得了长足进展，为新蛋白设计奠定了基础^[36,37]。华盛顿大学Baker团队设计了一个直径为25 nm、由三聚体蛋白质组成的正二十面体笼形结构模型，由大肠杆菌表达获得的产物与设计模型几乎相同。亚基与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合表达，能形成荧光“标准蜡烛”，用于显微分子成像。同时，设计了一个蛋白五聚体，来调节蛋白笼出入口通道大小^[38]，并且通过电荷互补实现了分子货物的可控包装^[39]。这种设计具有原子级精度，实现了百万道尔顿级蛋白材料的可控自组装，展现了靶向给药、疫苗设计方面的应用前景，为新一代基于基因编辑的蛋白质分子机器打开了大门。

植物源药物的生产受到资源、地域、气候、病虫害等影响。科学家一直尝试通过微生物来批量生产天然植物药物，但因植物药物的代谢通路十分复杂，有关研究进展缓慢。2006年，加州大学伯克利分校的Jay Keasling团队^[40]通过基因网络编辑，成功地在酵母菌中生产出青蒿素前体，成为合成生物学生产植物药物的范例。盖茨基金会立即注资，支持Keasling团队与Amyris公司联合开展后续研究，将产量从100 mg/L提

升到25 g/L。由于知识产权免费，这项技术有可能以较低价格向发展中国家提供更多的一线抗疟疾药物^[41]。另一项例子是，斯坦福大学Smolke团队^[42]通过基因组编辑在酵母菌中完全合成阿片类药物(Opioids)，未来可能对罂粟种植业产生重大影响。这项研究入选*Science*期刊2015年度十大科学突破。

3 中国合成生物学发展举措

中国合成生物学发展举措是全方位的，包括大量的学术活动和科技界与政府管理机构的互动。

3.1 香山科学会议

香山科学会议在中国享有盛名。科学家利用这个学术平台讨论前瞻性、基础性和战略性科学问题，并为科技管理部门提供建议(<http://www.xssc.ac.cn/waiwangNew/index.html#/xsscNew/homeNew>)。2008年会议(第322次)首次讨论了合成生物学的背景、进展和展望。2014年会议(第510次)讨论了合成生物学与中药。2017年会议(第552次)为国家设立合成生物学重点专项提供了重要思路。

其他重要影响的学术论坛如(上海)东方科技论坛和(苏州)冷泉港亚洲会议(Cold Spring Harbor Asia)等，都多次组织了专题讨论会。

3.2 “三国六院”会议

2010~2012年期间，中科院与中国工程院、英国皇家学会与英国工程院、美国科学院与美国工程院共同发起了“三国六院”系列会议(Six Academies Symposium Series)，主题为“发展合成生物学，迎接21世纪的挑战”(Positioning synthetic biology to meet the challenges of the 21st century)。第一次会议在伦敦召开，主题为“合成生物学与经济和社会生活”。会议对合成生物学进行了回顾和展望，讨论了实现其价值所需的资源、环境和必要条件。第二次会议在上海召开，主题为“合成生物学的使能技术”，重点梳理了合成生物学的新方法、技术、工具和平台。第三次会议在华盛顿召开，主题是“为了下一代合成生物学”，讨论了下一代工具、平台和基础设施以及相关的政策。美方组织者称，中方的积极参与大大提升了会议的价值。中科院上海生命科学研究院赵国屏担任“三国六院”会议中

方协调人,我在华盛顿会议上报告了中国合成生物学路线图草案。

“三国六院”会议总结报告提到:与之前的其他研究学科不同,合成生物学有可能绕过不太可预测的进化过程,开创一种新的、动态的处理生物系统的方法。合成生物学家希望设计和建造的工程生物体系具有自然系统中尚不存在的能力,这种能力最终可能被用于生物制造、食品生产和全球健康。同等重要的是,合成生物学作为一个科学和工程领域,它提出了技术、伦理、监管、安全、知识产权和其他问题,这些问题将在世界不同地区得到不同的解决^[43]。

“三国六院”会议对全球合成生物学发展有积极作用。中国参与共同主办,使中国的合成生物学很早就步入正常发展轨道,“与鹰共翔”^[44]。

3.3 国家科技重点专项

(1) 国家重点基础研究发展计划“合成生物学”专题。国家重点基础发展研究计划(“973计划”)(1997~2019),主要支持国家重大需求驱动的基础研究和重大新兴交叉科学前沿领域。2010年开始,在生物催化与生物转化研究方向的基础上,启动部署“合成生物学”专题研究。5年连续安排了10个项目(表1),为中国合成生物学发展奠定了重要基础。

除了科技部主管领导和相关管理人员以外,还要特别感谢杨胜利、欧阳平凯、曹竹安等人在“973计划”专家组层面所作的重要贡献,感谢当年中国驻英使馆科技公参陈富涛介绍我与英国皇家工程院《合成生

物学》报告^[45,46]起草人交流。我们建议在“生物催化与生物转化”方向的基础上启动合成生物学专题研究,得到了“973计划”专家顾问组组长周光召和徐冠华、副组长林泉、朱道本和陈佳洱等人的支持。

(2) 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项。随着国家科技计划管理改革,科技部在“973计划”合成生物学专题及国家高技术研究发展计划(“863计划”)相关部署的基础上,于2018年启动了合成生物学重点专项。该专项的一个管理创新是,深圳市投入了部分资源,这也是首个由中央财政和地方财政联合设立的国家科技重点专项。专项总体目标是针对创建人工合成生物的重大科学问题,围绕物质转化、生态环境保护、医疗水平提高、农业增产等重大需求,突破合成生物学的基本科学问题,构建实用性的重大人工生物体系,创新合成生物前沿技术,为促进生物产业创新发展与经济绿色增长等作科技支撑。

根据2018年和2019年公布的指南,专项的主要研究方向和重点研究任务概括为4个方面:基因组人工合成与高版本底盘细胞,人工元器件与基因回路,人工细胞合成代谢与复杂生物系统,使能技术体系、平台和生物伦理与生物安全评估等。

专项为中国合成生物学研究提供了一个稳定、持续的经费渠道。从“973计划”到重点专项,共立项支持了60多个重大项目及一批青年项目,所涵盖的方向和队伍形成中国合成生物学研究的基本盘并不断拓展,高水平成果持续产生。

表1 “973计划”合成生物学项目

Table 1 Synthetic biology research projects supported by the National Key Basic Research Program (973 program) (2011~2019)

项目名称	首席科学家	立项年份
人工合成细胞工厂	马延和	2011~2015
光合作用与人工光合叶片	常文瑞	2011~2015
新功能人造生物器件的构建与集成	赵国屏	2012~2016
微生物药物创新与优产的人工合成体系	冯雁	2012~2016
用合成生物学方法构建生物基材料的合成新途径	陈国强	2012~2016
抗逆元器件的构建和机理	林章凛	2013~2017
合成微生物体系的适配性	张立新	2013~2017
微生物多细胞体系的设计与合成	元英进	2014~2018
合成生物器件干预膀胱癌的基础研究	蔡志明	2014~2018
生物固氮及相关抗逆模块的人工设计与系统优化	林敏	2015~2019

3.4 构筑重点科研基地

重点科研基地指成建制的重点实验室和研究中心。过去10年中，许多高校和科研机构都有实际举措，其中最为集中的是上海、天津和深圳。

(1) 上海基地。2008年，中科院批准上海生命科学研究院成立合成生物学重点实验室，这是中国最早的建制化的合成生物学研究基地，其前身是分子微生物学开放实验室。赵国屏果断将实验室方向调整到合成生物学，建立合成生物学的关键技术平台，进行生物学元件、反应系统乃至生物个体的设计、改造和重建。2011年，科技部批准上海交通大学建设微生物代谢国家重点实验室。邓子新领衔，实验室聚焦微生物代谢基础理论的研究，形成了微生物合成代谢、微生物分解代谢、微生物代谢互作3个相互联系、互为依托的研究方向。2015年，上海交通大学联合其他机构成立了上海合成生物学创新战略联盟，旨在为合成生物学发展打下坚实基础，为生物产业发展提供核心支撑。

(2) 天津基地。天津市是中国合成生物学重镇，积累深厚。2018年，教育部批准天津大学建设合成生物学前沿科学中心(教技函〔2018〕76号)，目标是结合“双一流”建设，汇聚整合创新资源，率先实现前瞻性基础研究、原创成果的重大突破，发挥领域前沿引领作用。中心由元英进领衔。2019年11月，科技部发文支持天津与中科院共建、由中科院天津工业生物技术研究所(简称中科院天津工生所)联合有关单位建设国家合成生物技术创新中心(国科函区〔2019〕200号)，以合成生物学技术的知识产权生产、转化为主要任务，建立科学与技术、技术与产业的桥梁，推动经济社会绿色可持续发展。中心由马延和领衔。

(3) 深圳基地。深圳合成生物学发展如同其城市，后起之秀，充满活力。2017年，中科院批准深圳先进技术研究院(简称深圳先进院)成立合成生物研究所，并牵头组建深圳合成生物学协会，推动产学研一体发展。2018年，深圳市批准建设全国首个合成生物研究重大科技基础设施(深发改〔2018〕8号)。由于生物体系的高度复杂性，生物设计合成须经过海量的工程化试错。合成生物设施通过智能化的自动实验装置，快速完成“设计-构建-测试-学习”的闭环，极大提升研究效率，将为中国合成生物学研究解燃眉之急。深圳设施还参与成立国际合成生物设施联盟(Global Biofoundry Alli-

ance, GBA)，为大科学设施的全球合作提供一种积极的范式^[47]。同年，深圳市批准深圳先进院牵头组建深圳市合成生物学创新研究院(简称合成院)，与合成生物设施项目“二位一体”同步建设。2019年，中科院批准深圳先进院成立定量工程生物学重点实验室，聚焦发展合成生物学的理性设计能力。这一系列举措将催生“合成生物产业”与“自动高端生物仪器国产化”两条全新的产业链。深圳市科技创新委员会主任梁永生表示，希望合成院在国际化、创新、产业化方面深入谋篇布局，推动深圳在全国乃至世界生命健康领域的发展进程。刘陈立是深圳设施、合成院、所的牵头人。

(4) 学术组织及期刊。2018年，中国生物工程学会成立了合成生物专业委员会，由赵国屏担任主任委员，专家们携团队踊跃参加，微信成员迅速达到500人，成为合成生物学同行交流的重要平台。2019年，以深圳先进院为总部，成立了亚洲合成生物学协会，旨在加强国际合作，形成创新生态。此间，《生物工程学报》《中国科学：生命科学》《中国科学院院刊》《生命科学》等都相继出版合成生物学专辑。学者们还创办了合成生物专业期刊*Synthetic and Systems Biotechnology*，出版了《合成生物学》教材^[48]，并正在化工出版社的支持下筹办《合成生物学》期刊。这些举措为合成生物学的普及交流和水平提升发挥了十分积极的作用。

4 中国合成生物学研究影响力宏观分析

科学文献数据库(如Web of Science, Scopus等)是科学研究产出的客观纪录，已成为全球同行学者检索的主渠道之一。也是辨析科技发展规律和各国科学研究宏观贡献、国际合作和影响力的重要平台。以下分析数据源自Web of Science数据库，检索词为“synthetic-biology”，数据取近15年发表的文献。由于每篇文献的用词差异，本文中的分析结果应为“至少”，可参考。

4.1 中国学者发表国际论文数上升至第二

15年来，全球合成生物学相关文献量持速增长，从寥寥数篇到每年千篇以上。中国学者贡献的论文数自2015年以来跃升至第二(图1)。该现象与中国其他学科领域的情况类似。一般认为，国际科技期刊大多具有严

图 1 合成生物学领域发表国际论文最多的15个国家. 2015年起, 中国已经成为第二大贡献国. 数据源: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

Figure 1 Number of papers on synthetic biology authored by researchers in selected 15 countries. China has become the second largest contributor since 2015. Source: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

格的审稿标准, 说明中国学者产出大量符合国际评价标准的研究结果. 其中, 国际合作论文占比23%, 最大的合作伙伴是美国, 其次是英国和德国的学者和机构, 这也与中国整个基础研究论文情况类似.

4.2 中国学者国际论文影响力分析

论文被同行引用次数是衡量研究工作影响力的衡量指标之一. 中国学者合成生物学论文大幅增长的同时, 引用数量增长也十分迅速. 经过15年发展, 目前的总引用数已经增至第二位(图2A), 对整个领域发展的影响力不言而喻. 然而经归一化处理, 篇均影响力目前尚低于平均水平(图2B), 原因有3点: 一是整体质量还不够高; 二是论文数量增长快, 篇均引文增长滞后; 三是美国的论文数量和引用数都远高于其他国家, 提升了全球篇均引用数. 在发表论文数量最多的前15个国家中, 中国论文的篇均引用数为第11位.

另有一数据说明中国学者研究产出的影响力. 美国化学会会刊*ACS Synthetic Biology*和荷兰Elsevier出版公司的*Metabolic Engineering*是合成生物学领域的两份核心期刊, 编委会均由国际知名学者组成, 择稿标准高. 中国学者在这两份期刊上的论文贡献率已分别上升至20%和32%(均为第二位), 且势头不减(图3), 这从一个角度说明了中国学者研究产出的国际认可度.

4.3 研究领域分布

在Web of Science数据库中, 分别选取全球和中国近3年发表论文中引用次数最高的前100篇论文, 分析它们的研究方向, 归类于图4. 可以看出以下3个特点.

通过代谢工程来合成天然产物的研究最多, 且中国的产出多于全球的产出. 说明中国合成生物学代谢工程的基础比较好, 尤其重视天然产物合成.

中国学者比其他国家学者更加注重合成生物学与化工、能源和环保, 以及生物质能-电能转换等. 这可能说明中国有紧迫地解决能源和环境问题的需求.

相比较而言, 中国合成生物学研究在方法学创新、基因组信息分析和基因组网络编辑、医学应用等方向还比较薄弱, 需要实质性加强.

5 重要研究进展方向一: 基因组合成与高版本生物底盘

5.1 基因组合成与染色体工程

(1) 人工酵母基因组Sc.2.0. 合成酵母基因组计划(Sc.2.0)是一项国际科技合作计划, 其目标是用化学法逐一合成酵母的16条染色体, 并最终全部取代酵母细胞的天然染色体, 成为人工酵母细胞. 由于要对天然基因组进行再设计和改造, 故称2.0版本-Sc.2.0. 如前

图 2 中国研究人员近15年来不同阶段发表合成生物学国际论文的引用情况. A: 总引用数在国际上的位次变化; B: 归一化篇均引用变化(以世界平均值为1). 数据源: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

Figure 2 Ranking of citation of the synthetic biology related papers published by Chinese researchers at different time stages from 2005 to now. A: rank of total cites; B: normalized impact per paper. Source: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

图 3 中国学者在合成生物学两份核心期刊上发表论文的占比(%). 其中, *ASC Synthetic Biology*于2012年创刊. 数据源: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

Figure 3 Proportion (%) of papers published by Chinese researchers. *ASC Synthetic Biology* was founded in 2012. Source: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

文所述, 该计划由美国Jef Boeke发起并领衔. 中国、美国、英国、澳大利亚、新加坡等国科学家、中国科技部和美国科学基金会代表在北京召开了第一次协调会 (http://www.most.gov.cn/kjbgz/201205/t20120504_94093.htm).

酿酒酵母是第一个被全基因组测序的真核生物. 一方面, 设计和重建酵母基因组有助于更深刻地理解

一些基础生物学的问题; 另一方面可以通过基因组设计, 构建通用酵母菌底盘, 在基因产业上发挥更加重要的作用.

酵母基因组远大于细菌和病毒是Sc2.0项目的主要技术挑战之一. 已合成的脊髓灰质炎病毒基因组为7.5 kb, 生殖支原体基因组为1.08 Mb, 而酵母基因组为12 Mb, 基因合成和拼接都存在难度; 真核生物基因

图 4 中国与全球合成生物学的研究热点比较, 数据选自近3年引用最高的100篇论文. 数据源: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

Figure 4 The research hot topics in synthetic biology—A comparison between China and the world. The data are from the 100 most-cited papers in the past three years. Source: Web of Science, Clarivate Analytics, 30th November, 2019

组结构复杂、信息庞大, 设计的难度远高于原核生物.

天津大学元英进、清华大学戴俊彪(现中科院深圳先进院合成生物所)和华大基因杨焕明率各自团队承担了共6条染色体、5.24 Mb的合成任务, 约占总长度的43.4%. 迄今为止, 所合成的染色体在酵母细胞中的功能都得到验证^[49–52]. 2020年可完成最后一条染色体合成. 中国科学家的相关成果入选2017年“中国十大科学进展”. 标志着中国成为继美国之后第二个具备真核基因组设计与构建能力的国家.

(2) “16合1”染色体酵母. 酵母染色体合成如火如荼, 中科院上海植物生理生态研究所覃重军在思考一个基础性问题: 真核生物中的染色体数量因物种而异, 为什么会存在这种区别, 特定的染色体数量是否给物种提供了某种优势? 似乎越低等的生物染色体就越少, 可为何酿酒酵母却有这么多染色体? 大自然是否有点随意? 如果酿酒酵母染色体数目减少到一条, 会发生什么情况? 此前, 自然界还未发现过只有一条染色体的真核生物.

他决定探讨出个究竟. 从2013年开始, 覃重军团队^[53]利用基因编辑技术, 除掉重复序列, 简并着丝粒和端粒, 最终将酿酒酵母的16条染色体首尾拼接成1条超级染色体. 除了与野生酵母共培养时生存竞争力

较差外, 工程酵母依然具有代谢、生理、繁殖等细胞功能. “通过分析背后的原因和机制, 我们或许可以推演酵母如何进化, 并用这种极简生命来理解如人类般更为复杂的染色体进化, 这为研究生命本质开辟新的方向.”覃重军说. 2018年, 覃重军、薛小莉、赵国屏、周金秋等联合团队和Boeke团队在*Nature*期刊上同期分别发表了“16合1”染色体和“16合2”染色体酵母^[54]. “16合1”显然更具有颠覆性, 入选当年“中国科学十大进展”和“中国科技十大进展”. 我很荣幸地为之作科学进展点评^[55].

5.2 基因组编写计划

2016年, 美国科学家Boeke和Church等人提出了基因组编写计划(genome project-write, GP-Write). 作为一个开放性的国际合成基因组学研究项目, 该计划的首要目标为: 通过若干大基因组的合成推动相关技术的研发, 进而将基因组合成和测试成本在10年内降低至现在的千分之一以内, 促进对包括人类基因组在内的生命体系的更好地理解和应用^[56]. 最近, GP-Write技术讨论组提出了目前超大基因组合成所面临的技术挑战和可能的阶段性目标^[57]. 2018年的GP-Write年度会议上, 合作者宣布了第一个GP-Write项目: 通过基

因组的密码子重编程构建具有天然病毒抵抗能力等的“超安全细胞”(<https://engineeringbiologycenter.org/>).

在此基础上,戴俊彪团队提出了基因组编写计划中国项目(Genome Project-Write China, GP-Write China),并成立了基因组编写计划中国合作中心(http://www.sohu.com/a/208737582_690242).该中心旨在集成我国合成基因组学的优势力量,推动GP-Write项目在中国的开展,并在噬菌体、细菌、动植物基因组合成以及基因组深度设计等领域发起多项国际合作.

5.3 底盘细胞

底盘细胞是合成生物反应发生的宿主.由于细胞的复杂性,嵌入的合成装置或系统可能受到细胞原有无关代谢过程的影响.解决办法之一是删除一些非必需基因,构建简约基因组.这类似计算机软件中的“重构”(refactoring),即在不影响功能的情况下简化计算机

软件的过程.此举的另一个好处是减少细胞中其他代谢过程对能量和物质的消耗.实践中,还常常根据需要对底盘进行改造,包括嵌入、替换或删除一些基因或者基因模块.常见的底盘细胞,如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母菌、假单胞菌、丝状支原体等.目前正在考虑用动植物细胞作为生物底盘.中国学者构建的底盘细胞举例如表2.由于许多模式微生物都已经发展或者正在发展成为合成生物学的底盘,重点专项中的“高版本底盘”,是指功能升级版.

6 重要研究进展方向二：生物元器件和基因回路

6.1 合成基因回路与肿瘤治疗

(1) 膀胱癌的基因诊疗.蔡志明团队^[74]构建了能在体外特异识别并杀伤癌细胞的逻辑“与”门(AND gate)

表 2 中国研究人员构建的底盘细胞举例(包括综述部分文献)

Table 2 Example of chassis cells constructed by Chinese researchers (including a few suggested chassis in review articles)

底盘细胞	方法	应用	团队及参考文献
大肠杆菌	缺失含必需基因和非需基因的大片段,再将关键必需基因克隆到原位	解决必需基因散布在染色体上的难题,为创建其他生物底盘提供方法学思路	中科院上海植物生理与生态研究所 ^[58]
	简并TCA循环,与天然的睡美人变位酶(Sbm)循环相结合,构建一条氧化还原平衡的、有活力的厌氧丙酸发酵途径	丙酸盐生产	中科院天津天津工生所 ^[59]
	染色体工程	丹参酸A	天津大学 ^[60]
放线菌(链霉菌)	链霉菌细胞底盘综述		武汉大学 ^[61]
	中度嗜盐链霉菌,天然的简并基因组	次生代谢物生产	上海交通大学 ^[62]
枯草芽孢杆菌	综述		江南大学 ^[63,64]
	基因组简并,删除581.9~814.4 kb非必需基因序列	鸟苷和胸腺嘧啶核苷生产	天津大学 ^[65]
酵母菌	CRISPR/Cas9介导多基因整合到皮氏酵母基因组	方法学	华东理工大学 ^[66]
	6步生物合成途径重组到酿酒酵母细胞	生物碱(托品和假托品)生产	中科院上海植物生理生态研究所 ^[67]
假单胞菌	以绿脓杆菌为出发菌株,删除10.3%基因组,包括5个次生代谢基因束和17个菌株特异性区域(525个非必需基因)	二次代谢物生产	上海交通大学 ^[68]
乳酸球菌	基因组简并,删除5个非必需基因区域,达基因组的2.83%	重组蛋白生产	南开大学 ^[69]
盐单胞菌	通过染色体工程对TCA循环等进行改造	嗜极端微生物低成本生产工艺;聚3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸酯(PHBV)生产	清华大学 ^[70]
蓝藻(细长聚球藻)	开发并优化一系列遗传工具	光合作用固定CO ₂	天津大学 ^[71]
羧基酮丛毛单胞菌	合成生物学工具包	污染物降解和环境修复	中科院微生物研究所 ^[72]
植物	在烟草细胞中偶联叶绿体代谢工程和异戊二烯前体增强	合成紫杉醇中间体	中科院上海植物生理生态研究所 ^[73]

基因回路: 膀胱癌高表达启动子 *hTERT* 和膀胱组织细胞特异性启动子 *hUPII* 的细胞信息整合为输入, 荧光素酶报告基因为输出. 只有当两个输入在被测细胞系中都被激活时, 才激活输出基因, 由此能够特异性地检测膀胱癌细胞. 此外, 该团队还通过用其他细胞功能基因替换输出端来测试设计的模块性, 有效地抑制膀胱癌细胞生长, 诱导细胞凋亡, 或降低细胞活力. 研究还拓展到构造所有基本类型的布尔逻辑门(Boolean algebra)在哺乳动物细胞中执行逻辑信号操作, 通过控制双向(开-关)基因转录, 可以改变肿瘤信号转导, 实现癌细胞命运的重新编程^[75].

(2) 溶瘤病毒治疗肝细胞癌. 溶瘤病毒(oncolytic virus)是一类致病性较弱但具有嗜肿瘤特性的病毒. 清华大学谢震团队对溶瘤腺病毒进行改造, 插入可编程和模块化的合成基因回路(6.5 kb), 能够感知肝细胞癌特异启动子、肿瘤特异性microRNA和正常细胞特异性microRNA, 从而通过逻辑运算区别肝癌细胞和正常细胞, 使溶瘤腺病毒在肿瘤细胞中进行选择性复制. 而且, 将不同免疫效应因子的编码基因整合到腺病毒载体中, 在裂解肿瘤细胞的同时, 表达释放免疫因子, 提高杀伤性T细胞在肿瘤部位的富集, 刺激抗肿瘤免疫. 计算模拟表明, 编码免疫调节剂的溶瘤病毒比溶瘤病毒和免疫效应因子的联合治疗效果更好^[76].

6.2 拓展密码子编码非天然系统

(1) 拓展密码子合成抗病毒疫苗. 减毒疫苗保护性好, 但有持续性感染和病毒回复突变的风险. 北京大学周德敏和张礼和团队以甲型流感病毒为模型, 用拓展遗传密码子方法, 使病毒基因组携带多个过早终止密码子(premature termination codon, PTC). 经过优化的PTC工程病毒具有两个特性: (i) 在体内保留其全部免疫原性却难以繁殖, 从而大大降低持续性感染和传播的风险; (ii) 在转基因细胞中能大量繁殖并具有遗传稳定性, 由此解决活病毒疫苗生产问题. 用PTC病毒接种小动物能引起强烈的体液、黏膜和细胞免疫, 甚至中和现有的感染菌株^[77]. 这种策略能够将病毒直接转化为疫苗, 颠覆了疫苗的概念, 是合成生物学在疫苗研究中的范例, 入选2016年“中国十大科学新闻”.

(2) 光催化CO₂还原酶. 提高光合作用效率并建立

基于光合作用的化学转化是一项长期目标. 但光合系统复杂, 暂时难以设计回路工程. 同时, 尽管光系统 I 和光系统 II 可以协同地将NADP⁺还原为NADPH ($E^0 = -320 \text{ mV}$), 但NADPH的还原性不足以驱动CO₂直接还原为CO ($E^0 = -520 \text{ mV}$). 中科院生物物理研究所王江云团队^[78]发现, 超折叠荧光蛋白具有改造为类似天然光系统的光合蛋白质的潜能. 他们应用拓展遗传密码子技术和非天然氨基酸(光敏剂), 特异性地改造荧光蛋白发色团, 使其受光激发后能高效地向位于荧光蛋白折叠桶外的小分子CO₂电化学还原催化剂(三联吡啶镍合物)传递电子, 从而还原CO₂生成CO. 该方法的光量子产率为2.6%, 高于大部分已报道的CO₂还原催化剂.

6.3 生物固氮元件与基因回路

生物固氮需要众多基因协同完成. 相关基因的多样性、固氮酶的氧敏感性加上对能量和还原力的需求, 是将固氮功能移植到谷物中的主要障碍. 固氮系统可分为电子传递元件(electron-transfer components, ETCs)、金属簇生物合成所需蛋白质和固氮酶核心等3个功能模块. 其中, ETCs对还原力供给至关重要. 北京大学王忆平团队^[79]研究生物固氮元件的适配性和生物固氮基因回路的简并性发现, 在大肠杆菌底盘中, 来自叶绿体和白体(根中的叶绿体存在形式, root plastid)的铁氧还蛋白-NADPH氧化还原酶模块支持固氮酶的活性, 而来自线粒体的ETCs模块不能将电子传递给固氮酶, 但这种不相容性可以用NADPH依赖的肾上腺皮质素氧化还原酶和鱼腥藻铁氧体蛋白的杂合模块来克服. *Proc Natl Acad Sci USA*评论称该研究具有里程碑式的意义^[80].

继而, 借鉴病毒的多聚蛋白(Polypeptide)策略(即病毒将其各组分蛋白共转录、共翻译, 然后利用特异性蛋白酶剪切成各个蛋白肽段进行自身组装), 通过“合并同类项”, 将原本以6个操纵子(共转录)为单元的含有18个基因的产酸克雷伯菌钼铁固氮酶系统转化为5个编码Polypeptide的巨型基因, 并证明其可支持大肠杆菌以氮气作为唯一氮源生长^[81]. 理论上, 这一“超简固氮基因组”策略只需3个巨型基因就可构建出能够自主固氮的高等植物. *Proc Natl Acad Sci USA*期刊以“极端生物工程应对氮挑战”为题, 给与该研究高度评价^[82].

6.4 生物合成材料

(1) 极端微生物合成生物塑料. 生物塑料具有很好的环境价值, 但生产成本过高而难以实际推广. 清华大学陈国强团队^[83]巧妙地利用嗜极端环境微生物, 创建了一个海水生物反应器. 经过对嗜盐菌进行一系列优化, 获得了在高盐浓度和碱性条件下快速生长的嗜盐菌. 即使在不灭菌开发的条件下, 杂菌生长的机会也很小, 因而大大降低生产成本. 该工艺堪称“基于极端微生物的下一代工业生物技术”^[84].

进而, 对产生聚3-羟基丁酸-co-3-羟基戊酸酯(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV)的盐单胞菌(*Halomonas bluephagenesis*)进行改造. 删除了染色体三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)编码琥珀酸脱氢酶组装因子2和异柠檬酸裂解酶相关基因, 以增加PHBV的3-羟基戊酸(3HV)比率. 进一步采用突变、用葡萄糖酸盐激活产生丙酮酸途径、引入磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和玻璃颤菌血红蛋白编码基因等手段, 巩固提升3HV含量. 所构建的工程菌能以葡萄糖和葡萄糖酸盐为碳源产生PHBV, 细胞干重为6.3 g/L, PHBV占细胞干重的65%, 3HV摩尔比首次达到25%^[67].

(2) 代谢“时-空耦合”合成量子点. 荧光量子点以其独特的光学性能广泛用于生物标记和分子示踪. 但量子点制备存在化学污染和高耗能等问题. 武汉大学庞代文团队^[85]设计了代谢“时-空耦合”策略来合成量子点材料. 将酵母细胞中 Na_2SeO_3 的代谢和 CdCl_2 的解毒过程通过谷胱甘肽(glutathione, GSH)氧化还原联系起来. 细胞摄入的硒由GSH介导, 生成硒代三硫化物(GSSeSG), 再经GSH还原酶催化, 相继生成硒代硫化物(GSSeH)和Se-Cys. 进而, 在GSH的参与下, 合适价态的Se和Cd相遇生成CdSe量子点. 延长酵母细胞培养时间, 合成量子点的直径从2.69 nm增加到6.34 nm, 其发射光谱从绿(520 nm)到黄(560 nm)再到红(670 nm), 光学性质与化学合成一样. 该研究创造了温和可控的量子点生物合成工艺.

(3) 生物自组装合成多层级杂合材料. 多层级杂合材料是材料研究中的一个新方向, 但可控性组装是个难题. 上海科技大学钟超团队^[86]以生物膜(biofilm)为载体, 通过编程活细胞和精确的时空控制, 创造了有序的无机纳米物体(nano objects, NOs)和具有新功能

的生物-非生物杂化材料. 生物膜是微生物细胞群的聚集. 通过工程化大肠杆菌对蓝光的感知和生物膜卷曲纤维的产生, 实现了生物膜的空间控制和NOs的图形化组装. 在培养基中按时间顺序加入NOs, 随着生物膜的生长, 离散的NOs也逐层组装, 由此制备了多层生物-无机纳米异质结构薄膜. 所展示各种复杂的荧光量子点图案, 分辨率为100 μm . 这种方法可以成为新的纳米技术和复杂材料制备技术.

6.5 电能生物体系

电能细胞(即产电和亲电微生物)通过与外界环境进行双向电子传递和能量代谢, 可实现微生物电催化或产电, 包括微生物燃料电池、微生物光电技术、微生物电解池、微生物电发酵和微生物电合成等.

(1) 电能细胞电子传递效率. 电活性微生物细胞外电子转移(extracellular electron transfer, EET)速度慢是制约生物电化学系统实际应用的主要瓶颈. 细胞内NADH和 NAD^+ 的总水平是细胞内电子贮藏池的重要来源, 胞内电子通过EET途径转移到胞外电子受体. 天津大学宋浩团队^[87]以希瓦氏菌为模型, 通过3个模块将代谢流转向NAD生物合成: 从头合成、补救和通用生物合成模块. 结果表明, 细胞内总NADH和 $\text{NAD}(+)$ 水平提升导致更多的电子从电子供体氧化转移到EET途径, 从而增强胞内的电子通量和EET速率.

(2) 微生物光伏装置. 微生物的生物光电技术(bio-photovoltaics, BPV)利用光合微生物作为光吸收剂, 为可再生能源的生产提供了一种生物解决方案. 但由于光合微生物的输出电活性较弱, BPV的功率密度仍然较低. 中科院微生物研究所李寅、张延平团队^[88]开发了一种微生物联合BPV装置, 包括蓝藻细胞光合机器和希瓦氏菌胞外电子转移机器. 蓝藻细胞通过光合作用固定 CO_2 , 生成D-乳酸, 乳酸在希瓦氏菌细胞中转化生成乙酸、ATP、NADH和 CO_2 . NADH参与细胞膜上的代谢, 将电子传递给电极而生电. 实验装置包括时间分离模式和空间分离模式. 在时间分离模式中, 光和作用固C为充电状态, 黑暗中乳酸代谢为放电状态, 产生的功率密度超过150 mW/m^2 . 在空间分离模式中, 蓝藻和单胞菌被微孔膜间隔, 以确保充放电过程同时进行. 在培养基流加补充的时-空分离装置中, 系统能够稳定运行40天以上, 平均输出功率密度为135 mW/m^2 .

6.6 微生物降解环境持久性有机污染物

持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)的降解是环境微生物学研究的一项长期任务. 微生物在长期的适应性进化中产生了部分降解基因, 合成生物学的任务就是要利用这些基因来构建持久性污染物的完全降解或解毒途径.

六氯苯(C₆Cl₆; hexachlorobenzene, HCB)也列在POPs名单中. 中科院武汉病毒研究所(现上海交通大学)周宁一团队^[89]通过同源重组方法, 将编码细胞色素P-450cam变异株的基因模块(camA-camB-camC)整合到五氯酚降解菌的非必需基因区域. 重组菌株能以每小时0.67 nmol/mg(干重)的速率降解六氯苯, 并鉴定出中间产物五氯酚. 若进一步引入五氯酚降解基因模块, 降解将更加彻底.

羧基酮丛毛单胞菌近来被认为可以作为环境生物修复的底盘候选菌株. 它是多种环境的原生菌, 环境适应力强, 不吸收糖, 因此不与其他环境微生物竞争碳水化合物, 能同化许多芳香化合物, 能有氧地还原重金属, 有趋化作用. 但目前还缺乏该菌的遗传操作系统, 难以直接用于工程菌构建. 中科院微生物研究所刘双江团队^[69]提出了一个合成生物学工具包, 其中包括一个大肠杆菌-羧基酮丛毛单胞菌穿梭系统, 可以在大肠杆菌中高效地构建降解多基因回路, 并在羧基酮丛毛单胞菌中进行表型验证. 经过测试、表征和优化, 为最终建立底盘菌奠定了基础.

合成生物学与环境微生物学的结合起步较晚, 但应用前景乐观. 详细介绍可参见上海交通大学许平团队^[90]的综述文章.

6.7 生物纳米功能结构的设计与合成

受天然生物机器启示, 借助生物大分子自组装原理, 研究人员已经设计创造了多种类型的生物纳米功能结构, 成为合成生物学与纳米生物学交叉活跃的研究方向.

(1) 设计合成框架核酸结构. 通过将一条长的DNA单链与一系列经过设计的短DNA片段进行碱基互补, 可控地构造出复杂的纳米图案或结构, 称为DNA折纸(DNA origami)^[91,92]. 中科院上海应用物理研究所樊春海(现上海交通大学)团队精心设计构建了一系列DNA纳米结构并赋予各种功能, 如DNA-中国大陆版图^[93]、非标记单核苷酸多态性(single nucleotide poly-

morphism, SNP)基因分型^[94]、单分子结合反应原位监测^[95]、键合酶分子的可寻址纳米生物反应器^[96]、纳米药物载体^[97]、microRNA诊断^[98]、单分子力学基因分型^[99]、单分子实时酶级联反应成像^[100]以及复合二氧化硅纳米材料制备^[101]等. 为更合理地表述这类人工核酸纳米结构, 他们提出框架核酸(framework nucleic acids, FNAs)的概念^[102], 认为FNAs是一种具有独特物理、化学和生物学性质的新型核酸. 它们是真正的单分散纳米结构, 具有接近原子的空间分辨精度; 能对小分子、大分子或纳米颗粒进行定位组装; 它们在细胞内的分布与单链或双链DNA有显著差异, 具有可编程调节的力学性质. 一个半径在10~100 nm范围的FNA, 其持久性长度(persistence length)或刚性(stiffness)超过单链和双链DNA 4~6个数量级. FNAs的研究为合成生物学发展提供了丰富的想象空间.

(2) 设计合成蛋白纳米功能结构. 生物体通过指导的自组装合成种类繁多、功能特异的天然纳米结构. 它们在生命过程中扮演重要角色. 本人团队(李峰、门冬、王殿冰等)^[103]以病毒元件和细菌元件为组件(building blocks), 通过理性设计、细胞内重组和细胞外自组装, 合成了一维蛋白纳米线、二维蛋白纳米阵列、三维蛋白笼和多层级纳米结构. 将功能性蛋白或肽的编码基因与这些元件的编码基因融合, 或实施点击化学, 赋予这些生物纳米结构各种功能, 如催化、传感、生物成像、药物载体、肿瘤热疗、分子筛、超滤、组织工程、细胞培养支架等. 细胞外泌体是天然的纳米载体^[104,105], 但提高载药量一直是个难题. 采用基因编辑、重塑外泌体的方法产生细胞, 包括嵌入RNA适配子(aptamer)-蛋白质相互作用和可逆光诱导蛋白-蛋白质相互作用模块, 以及用胆固醇结合适配子修饰外泌体. 通过光控在细胞膜上富集内源性肿瘤相关microRNA的抑制剂miR-21海绵. 再经自然发生途径, 使miR-21海绵高效分选进入外泌体, 负载能力提高了14倍, 部分阻断了miR-21在白血病细胞中的功能^[106].

6.8 分子生物传感

生物传感器(biosensors)通常是由生物元件与物理、化学换能器耦合而成的传感器. 分子生物传感(molecular biosensors)不一定需要与换能器耦合, 它们具备分子识别和信号发生双功能, 已经广泛用于活细

胞内分子探测。

(1) 荧光生物分子传感. 荧光RNA(fluorescent RNAs, FRs)是结合荧光染料后发光的RNA分子. 但FRs亮度、稳定性低. 华东理工大学杨弋团队设计合成了一类HBC染料分子, 从RNA库筛选优化获得的适配子能特异性结合不发光的HBC后产生强烈荧光. 这些荧光RNA的颜色类似辣椒的多色性, 被称为“Pepper”. Pepper与HBC有纳摩尔级的亲和力, 稳定性好, 对外源序列融合插入兼容性高. 经过串联Pepper单体, 成像检测的灵敏度提高了一个数量级. 用该方法实现了活细胞内RNA动力学过程可视化示踪^[107]. 该团队的另一项设计是基于基因编码的光控转基因系统. 反式激活子在蓝光照射下结合启动子, 并在细胞和活体(小鼠)中快速启动靶基因的转录. 该设计模块为基因表达的时空调控提供了一种简便、鲁棒的方法, 可以在最小扰动的前提下实现对生物过程的调控^[108].

双分子荧光互补(bimolecular fluorescent complementary, BiFC)是一类基于荧光蛋白拆分后回补的分子传感器. 其原理是: 首先将荧光蛋白拆分, 形成两个不发光的片段N和C, 分别与待测相互作用的两个蛋白分子A和B融合, 在细胞中共表达. 若A与B发生相互作用, 与之相连的N和C荧光蛋白片段也被拉近, 并自组装复原成完整的荧光蛋白, 恢复荧光发射^[109]. 针对活体和细胞中对较短波长荧光的非特异性吸收和荧光背景干扰问题, 崔宗强和本人团队设计了红色、远红和近红外BiFC, 用于示踪细胞和活体内蛋白-蛋白、蛋白-RNA相互作用^[110], 以及用于细胞内三分子相互作用^[111]. 多组分相互作用测定的生物传感对细胞中生物分子机器和超分子复合物的作用机理十分有意义.

(2) 转录因子生物传感. 转录因子(transcription factors, TFs)通过直接或间接作用于基因启动子来调控基因转录. 许多微生物在长期进化中获得降解POPs的能力, 其降解途径受相应的TFs激活. 北京大学iGEM团队用TFs设计了测定芳香烃污染物的传感器^[112]. 4种TFs分别是萘、二甲苯、2-羟基联苯和苯酚的分解代谢途径的激活因子. TFs与荧光蛋白表达系统偶联成基因回路, 当有芳香烃靶标分子存在时, 系统即发生荧光. 检测体系具有光谱清晰、检测阈值低、动态范围宽等优点. 该设计在2013年iGEM竞赛中获得最佳新BioBrickPart奖并晋级总冠军赛(<http://2013.igem.org/Team:Peking>).

有一类TFs称为“别构转录因子”(allosteric TFs, aTFs). 它们含有两个功能域: DNA结合域和效应子结合域. 靶标分子的结合能改变TFs的构象, 从而增强或减弱与DNA的结合能力. 中科院微生物研究所张立新(现华东理工大学)、王为善、杨克迁团队依此原理创建了分子化传感平台^[113,114]. 目标小分子与aTFs结合, 导致DNA从aTFs解离. 解离的DNA通过其PAM序列结合到Cas12a-crRNA复合物上, 激活Cas12a的非特异性单链DNA反式切割活性, 切割两端分别含有荧光基团合荧光淬灭基团单链DNA探针, 使荧光基团与淬灭基团分离, 释放出荧光. 别构效应为小分子检测提供了一个全新途径.

7 重要研究进展方向三：合成代谢和人工复合生物体系

在合成生物学领域, 合成代谢方向发展早, 队伍强大, 成果不胜枚举, 这里难以逐一展开表述, 仅作概略.

7.1 天然产物生物合成

植物和微生物来源的次级代谢产物是天然活性物质的重要源泉. 然而, 植物提取的传统生产方式面临着野生植物资源匮乏、生长缓慢、病虫害、难于人工栽培、遗传操作困难等诸多难题, 微生物生产的天然化合物也有如何提高产率的问题. 中国是生物资源大国, 有长期的生物资源、植物化学和微生物代谢工程的研究基础, 为合成生物学研究奠定了很好的基础.

通过构建微生物底盘和重构基因回路, 已经生成了多种天然活性物质, 包括萜烯类, 如稀有人参皂苷(ginsenoside)^[115]、甜菊糖苷(steviolglycosides)(治疗记忆障碍药物)^[116]、番茄红素(抗氧化保健食品)^[117]、香叶醇江(食用香精)^[118]、苦皮藤素V(celangulin V)(蔬菜作物驱虫剂)^[119]等; 黄酮类, 如松属素(pinocembrin)(局部麻醉作用)^[120]、灯盏花素(brevi-scapine)(扩张脑血管, 抗血凝作用)^[121]等; 植物甾体类, 如菜油甾醇(campesterol)(植物激素)^[122]、21-托皮质激素(21-deoxycortisol)(药用糖皮质激素的前体分子)^[123]、薯蓣皂苷元(diosgenin)(甾体激素类药物的基础原料)^[124]等; 抗生素及药物类, 如链霉素和衣霉素^[125]、金红霉素^[126]、尼可霉素片段^[127]、氨甲酰多聚草氨酸^[128]、丹参酸A(salvianic acid A)^[129]、大麻素(cannabinoids)^[129]、羟基

酪醇(hydroxytyrosol)^[130]等。

有一些合成天然化合物的产量已经达到前所未有的水平,具有很强的工业价值。如张立新团队^[131]应用多组学方法揭示,在初级代谢中积累的胞内三酰甘油在细胞静息期被降解,基于此设计了一个“动态降解三酰甘油”的策略来稳定三酰甘油积累和增加聚酮的生物合成,使阿维菌素B1a的效价提高50%,在180吨规模达到9.31 g/L的工业水平。武汉大学刘天罡、邓子新团队^[132]通过生物合成法尼烯(farnesene),使维生素E生产工艺从7个步骤减少为3个,资金投入和生产总成本分别下降50%和30%,减少碳排放60%,一年多来累计新增产值20亿元。中科院天津工生所张大伟团队^[133]将来源于夹膜红细菌等5种细菌的28个基因整合组装在大肠杆菌中,解决了多基因的适配机制问题,实现了维生素B12的从头合成,产量提高250倍以上,发酵周期从180 h缩短至24 h。马延和团队^[134]在大肠杆菌中从头合成大麻素,成本是植物提取的1/200,化学合成的1/2。此外,王勇团队^[73]还在烟草植物底盘中实现了紫杉醇中间体紫杉二烯和5a-羟基紫杉二烯的异源合成,提供了一种用植物底盘异源合成复杂天然产物的成功案例。

7.2 新本草计划

随着植物天然产业合成生物学快速发展,王勇^[135]提出“新本草计划”。他指出,在全球范围内已发现的42万种植物中,已知的天然产物超过5万种,具有药用价值的约5万种,但被系统研究和开发的不足2%。合成生物学研究可以回答两个基本问题:(i)植物活性代谢物生物合成、转运及其调控机制是什么?(ii)如何实现植物体系中活性代谢物的高效定向合成?中国拥有丰富的生物物种和基因资源,并有长期的研究积累,推动“新本草计划”,有望全面提升我国的合成生物学研究和植物活性代谢物开发水平,实现引领性突破。

7.3 有机化学品的生物合成

有机化学品包括大宗化学原料、燃料和精细化工产品,主要产自于石油、煤等化石能源资源。生物转化技术在现阶段可作为传统生产的补充,长久目标是为化石能源资源的耗竭作技术储备。

代谢工程和合成生物学已广泛用来提高生物转化

效率,涉及到数百种化学品(也包括一些植物源化合物),如乙醇^[136]、2,3-丁二醇^[137]、1,3-丙二醇^[138-140]、原人参二醇^[141]、 α -松油醇^[142]、柠檬烯^[143]等。

生物转化的原料有3类:大宗生化原料(如葡萄糖和甘油等)、CO₂和农业剩余物。用葡萄糖或甘油为原料合成了丁二酸^[144-146]、戊二酸^[147]、己二酸^[148]、5-氨基乙酰丙酸^[149,150]等,预期目标是实现原子经济性。

CO₂的同化通常采用光合蓝细菌生物底盘。通过光合模块、CO₂固定和生物合成模块的重构和优化,实现了从CO₂生物合成酮、醇、酸等化学品,其中丙酮^[151]、D-乳酸^[152]、3-羟基丁酸^[153]为首次报道。

以碳一(C-1)为原料生产化学品可以大大降低与合成代谢底物相关的生产成本。然而,天然C-1同化途径通常涉及ATP的消耗或CO₂等碳源的损失,导致产品产量低。马延和团队^[154]通过计算分析6578个生化反应,设计了非依赖ATP消耗、理论碳原子经济性达到100%的人工途径,体外途径构建实现了88%的碳转化率。

中科院上海植物生理生态研究所杨晟团队和浙江大学林建平团队^[155]以产碱梭菌为底盘,结合代谢工程和进化工程,用脱壳玉米芯作为唯一的碳源,创建了一条产碱梭菌辅酶a依赖的丙酮-丁醇途径,为用农业剩余物生产化学品做出了示范。

7.4 人工复合生物体系

天然化合物异源从头合成(*de novo*)常常需要在一个生物底盘引入多个基因元件和基因回路,虽然已经有一些成功的例子(如前文所述),但难度非常大,而且实验结果常难预测。自然界微生物的共代谢(*co-metabolism*)和现有生物工艺中的混合培养(*mixed culture*)工艺提供了一种可以借鉴的复合生物体系形式(多细胞体系)。例如,通过转基因大肠杆菌和酵母的组合培养,开辟了植物碱生产的新途径^[156]。如前文所述,李寅、张延平团队^[88]设计的蓝藻-希瓦氏菌联合装置,通过光合作用固定CO₂,实现长时稳定的光电转化。宋浩团队^[157]设计的生物燃料电池由合成酿酒酵母-希瓦氏菌组成,以葡萄糖为底物,通过协同代谢产生电。

由于不同微生物的最佳生存条件不同,人工复合微生物体系的培养条件需要优化。这似乎比向同一生物底盘引入多基因回路更加容易控制。

8 重要研究进展方向四：定量工程生物学

合成生物学与定量生物学结合正在开辟一个新的方向-定量工程生物学(quantitative engineering biology)^[25]，即通过理性设计和精准地导入人工系统来定量地认知生命机制，践行“造物致知”。

8.1 生物基因回路或网络调控

生命系统是一个巨大的复杂系统，了解进化而来的系统性基因网络结构的“设计原则”不仅有助于建造人工生物系统，也有助于人们更加深刻地理解生命的本质。在人造的工程系统中，网络结构单元被广泛运用，例如负反馈、正反馈、前馈回路等。然而，由于缺乏对系统各组分的全面认知，传统生物学研究手段无法厘清各网络结构单元的边界，因而对网络结构单元在整个系统中的功能知之不详^[158]。Elowitz和Leibler^[31]构建的可视化“遗传时钟”周期为1 h，滞后于细胞分裂周期。这种“理性化的网络设计”可能会导致新的细胞行为工程，并更好地理解自然发生的网络。许多信号系统显示出适应能力，并在对刺激作出反应后能够自我重置。

北京大学汤超团队与加州大学Lim合作，揭示了在生物网络层次上如何实现生物适应性。他们重点研究了酶调控网络的适应性问题，在理论上穷举所有可能的简单的调控网络，发现具有适应性的网络有两大类：带缓冲节点的负反馈回路和带比例调节器节点的非相关前馈回路。在适当区域，含有这些拓扑结构的最小回路足以实现适应性。具有适应性的更复杂回路至少含有一个这种拓扑结构。上述分析导致产生了一个(生物)设计表，突出了适应性回路。尽管生化网络具有多样性，只有核心拓扑有限集才能执行特定功能。该设计规则为复杂自然网络的功能分类提供了框架，也可作为一本生物工程网络设计手册^[159,160]。近期，北京计算科学研究中心汤雷翰与王寿文^[161]通过生物适应性系统进行能量耗散分析，揭示了生物自适应系统中的驱动能量与相应的生物信号震荡之间的定量关系，该关系也为指导合成生物系统中的震荡信号通路提供了定量的理论基础。

人工网络调控原理还用来研究基础生物学难题。刘陈立团队^[162]通过合成基因回路对大肠杆菌细胞中关键基因的表达量进行线性调控发现，细胞内的复制

起点数目与细胞体积呈线性正相关，由此提出“复制起点对应增量”假说来解释决定群体细胞大小稳态的“加量”现象，即细胞两次复制起始事件间细胞体积的增加与起始时细胞内复制起点的数目的比值是一个恒定值，确认了细菌分裂受DNA复制控制。另一个微生物学经典问题是，细菌在用两种碳源培养时表现出不同的生长行为：两种碳源相继消耗或同时消耗(共利用)。为什么微生物会费心采用不同的吸收营养策略？汤超团队^[163]从代谢网络的拓扑特征获得线索，定量地解释了细胞作出选择的原因和方式，并为微生物碳源利用提供了一个定量框架。在干细胞领域中，日本学者山中伸弥^[164]创建了诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)，他用4种因子(OCT4, SOX2, KLF, c-MYC)实现体细胞重编程，将体细胞转变为iPS干细胞，因此获得2012年诺贝尔生理或医学奖。邓宏魁团队发现，OCT4和SOX2能分别被中内胚层和外胚层的发育和分化因子代替，汤超团队据此建立了“跷跷板模型”，定量表述中胚层基因和外胚层基因在重编程过程中的相互抑制和平衡的关系，从而重新认识了细胞重编程和细胞命运决定的机制^[165]。

生物系统的调控是信息流和物质流的统一。同样的调控分子和调控关系，在不同的资源竞争分配情况下，会表现出不同的调控特性。通过竞争共同的有限资源，不同的分子之间即使没有物理相互作用，也可以互相影响其浓度和功能活性。清华大学汪小我、谢震团队^[166]建立了分子竞争调控机理模型，解析了基因多靶点调控情况下的分子间非线性关联关系和资源分配规则，为人工合成生物系统的设计提供了理论支持。

原核生物和真核生物都有金字塔形的控制基因转录的递阶调控网络，使细胞能够对自然环境的变化作出反应。林章凛等人^[167]从转录调控蛋白和网络的操纵角度对如何通过工程化来改善微生物对工业相关胁迫的耐受性进行了深入分析。

8.2 生物系统的空间有序性

自然界存在许多由多细胞组成的生物形态、结构以及行为。例如，一个有趣的生态结构是群体细胞形成的“条带”状生物图纹。图案形成机理可以通过导入细胞通信基因元件和基因回路来研究^[168,169]。黄建东团队^[170]构建了一种结合细胞密度和运动性的合成遗传回路，将微观尺度的细胞基因表达及运动能力与宏观

尺度的细胞群体密度联系起来,使大肠杆菌细胞再生长并向外扩张时自主地形成高、底密度相间的周期性条纹图案.该团队通过模型分析,系统性地揭示了该类系统的动力学机制及其形成条纹结构相变条件,并通过实验实现了对生物周期条纹数量的控制.

群体迁移是一种重要的有序的生命现象.针对生物群体如何协调不同能力的个体实现统一的群体行为,傅雄飞与耶鲁大学Emonet团队^[171]构建了一个负反馈基因回路实现了菌株个体趋化运动能力的定量调控,并通过观测不同运动能力表型的群体趋化迁移发现,存在表型多样性的群体可以形成有序的空间分布结构,进而统一地整体迁移.

针对生物系统在空间定殖过程中如何产生空间有序分布这一基本科学问题,刘陈立团队^[172]在空间迁移进化实验的基础上,构建了两个负反馈基因回路,在不影响细菌生理条件下实现细胞空间迁移速度的线性调控,并通过两两竞争实验验证了竞争性生长迁移模型,提出了一个简单的数学关系,总结了细菌通过平衡生长和运动的进化策略来实现空间上的分布多样性.该研究对于构建稳定的合成多细胞系统、解释均质环境下如何维持生物多样性、预测物种迁移定殖的最优策略等问题提供了基础理论指导.定量工程生物学提供了一种思想方法,可结合工程化干预和生物计算精准地理解复杂的生命现象,从而揭示生命机制与物理、化学理论之间的内在联系.

9 重要研究进展方向五:使能技术与平台

合成生物学使能技术(enabling technology)主要包括DNA测序技术、DNA合成技术、基因组设计、合成与组装、基因编辑技术、元件工程(包括新蛋白设计)、回路工程、计算与建模等.

9.1 DNA测序技术

基因测序技术受人类基因组计划驱动迅速发展,经历了三代.目前的商业主流技术是第二代,通量高、成本低,但读长短,且准确度有待改善.北京大学黄岩谊团队^[173]提出一种“纠错编码”(error-correction code, ECC)测序法.结合边合成边测序(sequencing-by-synthesis, SBS)和纠错算法,利用多轮测序过程中产生的简并序列间的信息冗余,大幅度增加了测序精度.原始方

法的毛准确率是98.1%,而改进方法在200 bp片段中无一错误,这是对二代测序技术的重要提升.第三代测序基于纳米技术,读长可达1 Mb,但错误率和成本都很高.中科院昆明动物研究所张亚平和马占山团队整合条形码Illumina技术和第三代长读技术,成本仅为第三代测序的1/4^[174].迄今,测序技术发展呈现超摩尔定律,成本下降至百万分之一,时间从15年缩短至几周甚至几天,已经有千种以上的生物基因组被完全测序或即将完成测序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

9.2 DNA合成技术与合成基因组

如果说DNA测序技术迭代是颠覆性的,DNA合成技术的发展则是渐进式的,目前成本依然高昂.主流技术仍沿用经典的核苷磷酸法化学合成法,方法出错的概率为0.5%,有效的合成长度为200多个碱基.这是合成基因组最主要限制因素.目前,除了化学法需要创新以外,Church和Keasling两个团队均提出酶法.DNA多聚酶可以高效地合成DNA,但需要DNA模板.新技术采用不依赖模板的聚合酶末端脱氧核苷酸转移酶(template-independent polymerase terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT).TdT分子将碱基逐个连接到DNA引物,如此延伸一个碱基的时间是10~20 s^[175,176].目前,酶促合成法的长度已经增加到150 bp,虽然还不如化学法,但“竞赛开始热身”“任何能使其提速的技术都将非常有价值”“不要考虑诺贝尔奖”“这是硬工程”^[177].

国家重点研发计划“合成生物学”重点专项安排了“新一代DNA合成技术”研究主题.2019年指南包括:酶促DNA合成、寡核苷酸合成功能模块、基于多酶系统的DNA合成错误修复技术、基于荧光能量共振或激光扫描的DNA合成长度检测功能模块、DNA生物合成仪研制等.目标指标为:获得10个以上DNA生物合成酶元件;单碱基生物催化DNA合成速度较现有技术提高10倍以上;DNA生物合成长度较现有技术提高2~4倍,综合成本降低2~3个数量级(<http://www.most.gov.cn/mostinfo/xinxifenlei/fgzc/gfxwj/gfxwj2019/201906/W020190614372907815983.pdf>).

合成基因组的另外两个要素是DNA片段拼接组装和基因组设计.随着基因组增大,DNA片段拼接技术也成为基因组合成的限制因素.基因组设计包括基因组简并(删除非必需基因或冗余片段),密码子的简

并性和偏好性及优化,以及在合适的位点插入所需要的基因部件或回路。中国团队在酵母基因染色体合成的研究中积累了重要的经验。戴俊彪团队开发了多菌株并行替代的染色体构建策略,发明了基于酵母二倍体减数分裂的染色体整合技术^[52],有关论述可参见他们撰写的专门综述^[178]。Church特别提到天津团队用基因编辑工具CRISPR/Cas9来修复合成基因组中的错误^[179]。Beoke在美国国家公众电台(National Public Radio, NPR)接受采访时说,“酵母染色体合成团队发展了有效的方法来识别和修复合成基因组中的错误,类似于计算机程序编写中的除错。为合成更大的基因组(如植物、动物和人)奠定了基础。”(<http://www.tingroom.com/lesson/npr2017/3/399594.html>)

9.3 计算机技术与生物信息学

合成生物学基于系统生物学,具有大数据特征,计算机信息技术是必不可少的工具。大规模基因组测序、合成与组装离不开超算平台。人工元件和组件的适配性预测和标准化、基因回路和复杂合成途径及人工细胞的设计与功能模拟,基因网络中的未知代谢途径的发现和挖掘、DNA为存储介质的在体存储和读取解码、新(功能)蛋白的设计等,都需要运用计算机算法、建模和模拟。汪小我指出,随着合成基因回路规模的增加,传统的设计思路的瓶颈逐渐凸显,许多之前被忽略的因素对大规模基因回路的性能可能造成显著影响,这为合成基因线路的设计带来了新的挑战。其团队基于理性设计的思路,从模拟-数字运算设计、网络拓扑设计、基因回路中的信息传递理论和动态信号在合成基因回路中的应用等几方面进行了归纳和展望^[180]。

9.4 基因编辑与基因组工程

基于CRISPR系统的基因编辑工具在合成生物学中获得广泛应用。考察和解决脱靶效应和多基因编辑是当前的研究热点。中国学者开展了广泛的探索研究,仅在2019年就发表了大量文献。例如,在基因编辑效率方面,中科院遗传与发育生物学研究所高彩霞团队^[181]发现,胞嘧啶碱基编辑诱导水稻全基因组的非靶向突变;中科院上海生命科学研究院杨辉、李亦学团队与斯坦福大学Steinmetz团队^[182]开发了名为GOTI的方法来检验基因编辑脱靶突变;杨辉、周海波、李亦学团队和四川大学华西第二医院郭帆团队^[183]证实了DNA

单碱基编辑工具CBE和ABE均存在大量的RNA脱靶效应并提出用工程脱氨酶消除有关非靶向效应;香港大学黄兆麟团队^[184]设计了一个高通量平台,通过对化脓性链球菌Cas9蛋白的组合突变和系统性筛选,获得突变体Opti-SpCas9,它在不牺牲效力和广泛靶标范围的前提下,具有增强的编辑特异性。在多基因编辑和基因组工程方面,戴俊彪团队联合曼彻斯特大学蔡毅之团队创建了染色体重排菌株的快速和高效筛选ReS-CuES系统^[185]和目标代谢物优化生产的酵母合成染色体重排正交系统^[186],并与上海理工大学高冠军团队提出了用于改变组蛋白基因在黑腹果蝇原始基因组环境中的数量和序列CRISPR/Cas9和attP/attB双整合系统^[187];北京化工大学刘子鹤团队^[188]报道了用于酿酒酵母的快速多重gRNA-tRNA阵列CRISPR/Cas9(GTR-CRISPR)基因编辑系统,这种方法可以在3天内破坏6个基因,验证效率为60%,未优化gRNAs验证效率为23%;北京大学魏文胜团队^[189]通过工程化RNA招募内源性ADAR对RNA进行可编程编辑(leveraging endogenous ADAR for programmable editing of RNA, LEAPER),成功修复源于Hurler综合征病人的 α -L-艾杜糖醛酸酶缺陷细胞。

9.5 合成正交系统

正交遗传系统的组成包括非天然碱基对、移位密码子、非天然氨基酸、相关酶和启动子等。它们与天然的生物系统组成交叉很少,能在底盘细胞中并行或独立发挥作用。这方面研究在重点专项和国家自然科学基金都有安排。然而,合成生物学研究中,更多地是将天然的异源基因回路引入底盘细胞中,以预期与宿主背景正交。为了避免或降低引入的回路对底盘细胞生理的干扰,中科院微生物研究所姜春波团队^[190]通过RNA-Seq转录组分析来量化具有代表性的异源和门电路与宿主大肠杆菌在不同条件下的相互作用,包括回路设计和质粒拷贝数。研究表明,引入回路的质粒拷贝数是影响宿主细胞中异源回路正交性、代谢负载和功能的关键因素。研究结果为设计正交、鲁棒性基因回路提供了指导,使引入的基因回路对宿主的干扰和负担降到最低。

9.6 新酶设计

新基因自然进化要经过以百万年计的漫长年

代^[191]. 人工设计新酶基因依赖于对蛋白结构与功能的深刻理解. 依据已有的蛋白结构模板从头设计(如同源建模)已经取得长足进步^[36-39,192]. 刘海燕和初环宇^[193]通过能量优化提高了设计可折叠蛋白的成功率. 中科院天津工生所江会峰团队、中科院微生物研究所李寅和山东大学刘永军团队^[194]设计并制造了乙醇醛合酶, 继而创造了一个合成乙酰辅酶A的碳一(甲醛)代谢途径. 中科院微生物研究所吴边团队与荷兰Groningen大学Janssen团队^[195]合作, 基于结构计算, 设计出一个高效的天冬酸酶, 对底物耐受性和转化率显著提高. 这方面更全面的信息可参考江会峰团队^[196]的综述. 设计新酶最大的挑战是无蛋白结构模板, 这主要受限于蛋白高级结构的预测准确度. 蛋白质结构预测历史悠久, 但进展缓慢. 然而最近, 曾经战胜人类象棋和围棋冠军的Google DeepMind的AlphaGo转身进入蛋白结构预测领域, 开发了深度学习程序“AlphaFold”, 在2018年的国际蛋白结构预测竞赛(Critical Assessment of Protein Structure Prediction, CASP)中遥遥领先于其他团队. 这是人工智能和机器学习在生命科学中的又一范例.

9.7 合成生物学资源平台

合成生物学的发展离不开共建、共享的数据平台, 如基因库(如GenBank)和蛋白质结构数据库(Protein Data Bank, PDB). 目前, 中国先后在深圳和北京建设了国家基因库(<https://www.cngb.org/index.html>)和国家基因组科学数据中心(<https://bigd.big.ac.cn/>), 它们将与国际数据库共同支持生命科学发展.

合成生物学领域中也建立了一些专门数据库, 如iGEM生物元件数据库(https://parts.igem.org/Main_Page). 该元件库已注册了2万多份有文件支持的元件, 并分类为元件形式、底盘、功能等, 包括“干”实验室(dry lab)和“湿”实验室(wet lab), 即通过计算机模拟以及生物信息学方法来进行研究和通过在实验室采用分子、细胞、生理学实验方法进行研究; 该元件库还设计了友好的界面, 为参加iGEM竞赛团队提供免费支持. 通过参赛, 中国学生学者为该元件库也做出了大量贡献.

中国相关学术机构也十分重视合成生物学资源库建设. 目前最具规模的是天津大学的合成生物学模块库(SynbioML@TJU, <http://www.synbioml.org/>)和中科

院上海植物生理生态研究所的“合成生物学元件与数据库”(Registry and database of bioparts for synthetic biology, <http://npbiosys.scbit.org/>). 天津库的目录是初级代谢模块、产物模块、其他模块、生物底盘、构筑元件, 实物库逾5000种. 上海库的目录包括: 天然产物化合物、元件(催化元件、转运元件、调控元件)、天然产物合成途径(初级合成模块、骨架合成模块、后修饰模块)和微生物底盘(链霉菌、大肠杆菌、酿酒酵母菌和木霉真菌). 资源库包括数据库和实物库, 数据库可任意访问, 通过一定的协议方式可以获得实物. 资源库的建设有3个要素: 库容量、数据质量(元件的表征数据和标准化)和共享共建机制. 2018年, 中科院上海生命科学研究院、天津大学、中科院微生物研究所、中国科技大学、北京大学、上海交通大学联合承担了合成生物学重点专项的相关任务, 该任务主要研究目标之一就是针对天然化合物的合成生物学研究建立一个含有10万个元件及表征信息的元件数据与实体库(周志华, 个人通讯).

10 中国学生与iGEM竞赛

国际基因工程机器大赛(International Genetically Engineered Machine Competition, iGEM)是合成生物学领域的国际顶级大学生科技赛事, 也是涉及生命科学、化学、物理学、数学、计算机等领域交叉合作的跨学科竞赛(https://igem.org/Main_Page). 它始于2003年麻省理工学院的一门独立研究课程, 2005年发展成为国际赛事. 起初主要针对在校本科生, 后逐渐扩大到研究生和高中生. 竞赛组织者也因此成为一个非营利性组织(<https://igem.org/About>), 致力于教育和竞争, 促进合成生物学的发展, 发展开放的社团与合作.

iGEM有3个主要项目: iGEM竞赛、实验室项目(鼓励学术实验室使用相关资源开展研究)、标准生物元件和模块(Biobricks)的注册——一个不断增长的基因元件库. iGEM比赛要求学生自主选题, 利用课余时间合作完成相应的实验工作, 这充分锻炼了学生的独立学术能力和团队协作能力, 同时也培养了学生对科学的热情. 参赛学生可将研究所取得的成果提交给麻省理工学院的竞赛组委会, 供全球科学家共享; 同时该项竞赛为不同国家、不同专业的大学生提供了一个相互交流的国际舞台, 还使学生们有机会通过合成生

物学研究来解决现实中的问题，发展负责任的生物技术。

iGEM比赛规模不断扩大。2019年，来自全球45个国家和地区的近400支大学及中学队伍参赛，总参赛人数逾5000，中国128支队伍参赛，包括中国内地94支参赛队和34支港澳台的参赛队。

中国学生在iGEM竞赛中表现优秀，2007年首度参赛便获得总冠军(Grand prize)和4枚金牌(北京大学、天津大学、清华大学、中国科技大学)，近3年获得的金牌数占金牌总数30%以上。部分金牌获得者被提名参加总冠军角逐，13年以来，总共取得3次大学生总冠军和两次高中生总冠军(表3)。

2019年的iGEM竞赛中，来自深圳大湾区的高中生团队，凭借他们的“蜘蛛侠战衣”(彩色蛛丝蛋白)项目，从全球的74支高中生队伍中脱颖而出，蝉联总冠军大奖，并获得最佳硬件、最佳新型基础生物元件、最佳元件组合、最佳展示、最佳网页(Wiki)等5项最佳奖和iGEM人奖以及6项最佳奖项提名。中国台湾的成功大学团队，夺得了本科生组总冠军；清华大学团队获得最佳新应用和最佳新组件2项奖；华东理工大学团队获得最佳制造奖；蓝晶微生物(Bluepha，深圳)团队获得最佳新模型奖。

大湾区高中生团队来自深圳21所高中，获奖项目

为“色素蛋白与天然染料”(chromoprotein and natural dye)。他们期望通过在大肠杆菌中合成蜘蛛丝蛋白来编织蜘蛛侠的战斗服。蜘蛛丝是一种性能优良的新型材料，但蜘蛛不适合养育。目前的方法是从其他底盘生物生产重组蜘蛛蛋白(丝蛋白)。该团队尝试在大肠杆菌中合成蜘蛛丝蛋白和天然色素。在优化实验之后，他们或者用天然染料染色，或者用色素蛋白与蜘蛛丝蛋白混纺，在自制的简易纺丝设备上获得了漂亮的彩色蜘蛛丝。该团队称这项研究有助于拓展新生物材料的市场，并提高公众对纺织品污染的认识(https://2019.igem.org/Team:GreatBay_SZ)。

清华大学团队构建了首个原核生物人工相分离系统(phase separation system)。这些液滴在大肠杆菌中表现出与真核生物相似的球形和高流动性。通过在细胞内形成无膜细胞器和施加激光开关，可以使蛋白质和小分子有机物等靶标分子在细胞中重新分布或复原。相分离是当前基础生物学的一个研究热点。团队称，通过同步分离特定的物质，能使一个大肠杆菌菌落成长为具有细胞分化特质的群体(<https://2019.igem.org/Team:Tsinghua>)。

华东理工大学设计的纸浆转换器旨在解决废纸循环利用过程中短纸浆纤维对纸张质量的影响问题。通过实现短纸浆纤维的前降解和细菌纤维素的后原位合

表 3 中国内地学生在历年iGEM竞赛中所取得的成绩

Table 3 Achievements of Chinese mainland students in iGEM competitions over the years

年度*	金牌数**	银牌数	铜牌数	总冠军(Grand Prize)
2007	4/34	0	0	北京大学
2008	0	1	3	
2009	5/46	1/19	0	
2010	6/62	1/15	0	
2011	6/67	2/21	6/32	浙江大学
2012	12/85	8/29	1/30	上海交通大学
2013	25/92	6/42	4/33	
2014	16/101	11/36	11/60	
2015	23/115	11/57	4/55	大湾区高中(深圳)
2016	31/112	15/74	8/79	
2017	33/109	13/39	19/103	
2018	36/114	22/68	16/107	
2019	60/163	17/77	9/57	

*, 2007年, 中国学生首度参赛. **, iGEM网页(https://igem.org/Previous_Competitions)对历年比赛结果的数据进行归纳, 将各方向最佳奖也归于金牌栏目, 因而显著性地多于实际金牌数. 本表数据只计算了历年公布的金牌数(未包括各方向最佳奖)

成,可以制造复合材料,改善再生纸混入纸浆时的性能(https://2019.igem.org/Team:ECUST_China).

蓝晶微生物团队是来自北京大学、清华大学和天津大学的大学生,其获奖项目是生物继电器(biological relay).团队设计的正交重组酶能适应不同的遗传电路,有助于提高人工生物系统的模块化程度(https://2019.igem.org/Team:GENAS_China).

iGEM的长远目标是希望通过学术竞赛的模式,实现生物学的系统化、工程化,促进生物工具的开源化、透明化发展,帮助构建一个安全、有效的生物技术工程体系. iGEM赛况和研究成果每年都受到科学和社会媒体关注,具有广泛的国际影响力.中国也可考虑依托学会来组织相关竞赛.

我在合作指导中国科学院大学iGEM金牌团队的过程中,切身感受到学生青年们对科学的执着,对困难的无畏,见证他们在合成生物学科学实践过程中的不断成长、成熟.可以说,中国iGEM团队的表现,代表着中国合成生物学的未来.

11 合成生物学伦理、政策、法规框架

与其他许多科学技术一样,合成生物学在促进科学进步和贡献人类福祉的同时,也被视为“双刃剑”,存在生命伦理考量和生物安全风险.因此,全球科技界乃至全社会都予以高度关注.“三国六院”会议专门讨论了有关主题,英国、美国发布的相关路线图也都有专门安排.对这一议题的重视程度,体现文明程度和治理的水平.我曾受中科院委托参加全球科学院网络(Global Network of Science Academies, IAP)合成生物学工作组,与欧盟委员会(European Commission, EC)三个独立的科学委员会就合成生物学潜在风险开展对话.在王国豫、方心等人发起的“会聚技术(NBIC)的伦理问题及其治理”的香山科学会议以及其他与合成生物学相关的香山科学会议上,专家们达成共识.合成生物学的目的是创造有基础研究或应用价值的新型生物体,需要健全合成生物学管理文件与法规、建立和规范实验室工作的备案制度、加强对专业人员的安全教育培训、建立科普宣传平台、合理引导公众舆论等.简言之,生命伦理学研究、教育、政策和法规研究制定要相伴而行,为合成生物学健康发展保驾护航.

为此,科技部在2018年的合成生物学重点专项中

启动了相关研究,由华中科技大学联合相关团队开展.2020年的专项指南已经通过网上征求意见,拟继续安排,强化部署相关研究.更重要的是,2019年7月24日中央全面深化改革委员会第九次会议审议通过了《国家科技伦理委员会组建方案》.同年10月21日,《生物安全法草案》首次被提请十三届全国人大常委会第十四次会议审议.这些部署和措施,将对中国合成生物学研究产生积极影响.

12 结语

21世纪以来合成生物学的发展,驱动力源于3个方面:科学家对生命机制的理性探索(如基因网络调控原理和逻辑门的设计等);多学科的介绍(系统生物学、工程学、化学生物学、计算机科学等);相关领域专家的远见和执着.这些专家主要来自遗传学及基因组学、微生物学及代谢工程学、生物化工与工程学等领域.这在中国尤其明显,相关进展也最为突出.

如今,合成生物学已经展示出其强大的能力和更重要的使命.如同基因组学将生命科学研究推进到系统生物学,合成生物学也将在一定程度上改写生命科学研究范式,即通过设计和创造生命体系来理解生命,探寻是否还有支配生命体这种复杂系统的自然法则.又如基因克隆产生了当代生物技术,合成生物学通过基因网络工程,将全面构筑未来的生物技术和工程生物学(engineering biology).除合成代谢、合成基因组等经典研究方向以外,定量合成(工程)生物学、医学合成生物学、农业合成生物学、材料合成生物学、环境合成生物学、能源合成生物学等正在成为合成生物学中新的方向.合成生物学与信息技术的结合,可以发展DNA存储技术,突破现有存储技术瓶颈限制^[197];与生态学结合,有助于保护和恢复而不是摧毁生物多样性;与环境技术相结合,可以设计强大的分解代谢途径来降解顽固的POPs;与化学工程学结合,可能为量大面广的低劣生物物质的高效转化提供解决方案,实现可持续绿色能源和循环经济;与医学结合,可能为遗传性疾病和复杂性疾病的治疗提供更好的诊疗方案,为再生医学提供定制化的组织器官等.如果说新一轮科技革命浪潮已形成,合成生物学则正在其中涌动.

曾经在伦敦的一个高端科技发展论坛上(DEMOS conference, 2007),我受科技部委托报告中国科技发展

态势。一位英国学者向我提问，中国古代科技文明程度很高，为什么科技革命发生在欧洲而不是中国？我说，这是著名的李约瑟难题，建议从他的书中找答案。提问者耸耸肩说，“我就是现任的李约瑟研究所所长”(Christopher Cullen)，大家笑了，原来是明知故问。他又问：中国现在科技发展很快，有没有可能抓住下一轮科技革命的机会？我说，这是个好问题，可以一起探讨，于是将他介绍给中国科学技术发展战略研究院。后来，我为此写了一篇文章“新李约瑟命题”^[198]。我用这个例子来比喻中国的合成生物学。无疑，美国学者

的一系列颠覆性创新引领了合成生物学发展。然而，中国科技界及时携手并通过国际合作开创了新局面，我很荣幸地见证了这一进程。如今，一流成果正在中国涌现，部分已经开始转化，回馈社会。撰写本文过程中，浏览这些科学成果和故事，如同阅读研究者的智慧和匠心，被启迪、感动。虽然我们在科研生态、底层创新和成果转化等方面还存在差距，需要系统性改革，多年前起草的合成生物学路线图也依然“还在路上”，但这一次，我们可以回答，中国不会再次失去历史机会。

致谢 在撰写本文过程中，作者就有关问题请教过相关专家和管理人员(按姓氏笔画和单位)：马延和、江会峰(中国科学院天津工业生物技术研究所)、元英进(天津大学)、王德平(科学技术部生物中心)、王殿冰、朱冰、向桂林、张宏(中国科学院生物物理研究所)、刘陈立、戴俊彪(中国科学院深圳先进技术研究院)、李伯良(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所)、林敏(中国农业科学院生物技术研究所)、周志华、赵国屏(中国科学院上海植物生理生态研究所)、崔拓和崔春宇(科学技术部)，在此一并致谢。

参考文献

- 1 WA D. Synthetic biology and the mechanism of life. *Nature*, 1913, 91: 270–272
- 2 Pai S T. Diploide Intersexe bei Chirocephalus nankinensis Shen. *Sci Rec*, 1942, 1: 187–197
- 3 Pai S T. Yolk granules and cell reconstruction (in Chinese). *Science*. 1942, 26: 38–49 [贝时璋, 卵黄粒与细胞之重建. *科学*, 1942, 26: 38–49]
- 4 Chen C C, Cao M S, Lan B X, et al. Electron microscopic observation on the reconstituted cells of Nanjing fengnianchong yolk granules *in vitro* (in Chinese). *Sci China B Ser*, 1982, 12: 888–891 [陈楚楚, 曹懋孙, 蓝碧霞, 等. 南京丰年虫卵黄颗粒在离体培养下重建细胞的电子显微镜观察. *中国科学B辑*, 1982, 10: 888–891]
- 5 Pai S T. Cell Reconstruction, Vol. 1 (in Chinese). Beijing: Science Press, 1988 [贝时璋. 细胞重建, 第一集. 北京: 科学出版社, 1988]
- 6 Pai S T. Cell Reconstruction, Vol. 1 (in Chinese). Beijing: Science Press, 2003 [贝时璋. 细胞重建, 第二集. 北京: 科学出版社, 2003]
- 7 Schrödinger E. What is Life. Cambridge: Cambridge University Press, 1944
- 8 Watson J D, Crick F H C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171: 737–738
- 9 Vigneaud V, Ressler C, Swan C J M, et al. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J Am Chem Soc*, 1953, 75: 4879–4880
- 10 du Vigneaud V, Ressler C, Swan J M, et al. The synthesis of oxytocin. *J Am Chem Soc*, 1954, 76: 3115–3121
- 11 Sanger F, Thompson E O P. The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J*, 1953, 53: 353–366
- 12 Sanger F, Thompson E O P. The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J*, 1953, 53: 366–374
- 13 Ryle A P, Sanger F, Smith L F, et al. The disulphide bonds of insulin. *Biochem J*, 1955, 60: 541–556
- 14 Gong Y T, Du Y C, Huang W D, et al. Complete synthesis of crystalline bovine insulin (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 1965, 16: 941–945 [龚岳亭, 杜雨苍, 黄惟德, 等. 结晶牛胰岛素的全合成. *科学通报*, 1965, 16: 941–945]
- 15 Kung Y T, Du Y C, Huang W T, et al. Total synthesis of crystalline insulin. *Sci Sin*, 1966, 15: 544–561
- 16 Nui J Y, Zou C L, Wang Y, et al. The synthesis of insulin from A and B chains and synthesis peptide segments of A and B chains (in Chinese). *Chin Scie Bull*, 1964, 943–962 [钮经义、邹承鲁、汪猷, 等. 从胰岛素A及B链重合成胰岛素以及A及B链肽段的合成. *科学通报*, 1964,

- 943–962]
- 17 Yu C, Wang Y L. Wang Yinglai, former director of the Shanghai Institute of Biochemistry, talks about the synthesis of bovine insulin (in Chinese), *Life Sci*, 2015, 27: 761–765 [于晨 王应睐. 王应睐所长谈牛胰岛素的人工合成, *生命科学*, 2015, 27: 761–765]
 - 18 Khorana H G, Buuchi H, Ghosh H, et al. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp Quantit Biol*, 1966, 31: 39–49
 - 19 Wang D B, Zheng K Q, Qiu M S, et al. Total synthesis of yeast alanine tRNA (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 1982, 27: 106–109 [王德宝, 郑可沁, 裘慕绥, 等. 酵母丙氨酸转移核糖核酸的全合成. *科学通报*, 1982, 27: 106–109]
 - 20 Wang D B, Zheng K Q, Qiu M S et al. Total synthesis of yeast alanine transfer ribonucleic acid. *Sci Sin B-Chem Biolog Agri Med Earth Sci*, 1983, 26: 464–481
 - 21 Hobom B. Surgery of genes at the doorstep of synthetic biology. *Medizinische Klinik*, 1980, 75: 14–21
 - 22 Rawls R L. ‘Synthetic biology’ makes its debut. *Chem Eng News*, 2000, 78: 49–53
 - 23 Tavassoli A. Synthetic biology. *Org Biomol Chem*, 2010, 8: 24–28
 - 24 EPSRC UK. Synthetic Biology Roadmap. 2012
 - 25 Liu L Z, Bai Y, Zheng H, et al. Fundamental aspects of synthetic biology (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 351–323 [刘立中, 白阳, 郑海, 等. 合成生物学在基础生命科学研究中的应用. *生物工程学报*, 2017, 33: 351–323]
 - 26 Liu C, Fu X, Huang J D. Synthetic Biology: A new approach to study biological pattern formation. *Quant Biol*, 2013, 1: 246–252
 - 27 Zhao G P. Synthetic biology: Unsealing the convergence era of life science research (in Chinese). *Bull Chin Acad Sci*, 2018, 33: 1135–1149 [赵国屏. 合成生物学: 开启生命科学“会聚”研究新时代. *中国科学院院刊*, 2018, 33: 1135–1149]
 - 28 Zhang X E. Preface to special issue of synthetic biology (in Chinese). *Bull Chin Acad Sci*, 2018, 33: 1132–1134 [张先恩. 合成生物学专刊序言. *中国科学院院刊*, 2018, 33: 1132–1134]
 - 29 Deng Z X. Synthetic biology takes advantage of the golden age, building to know, building to use (in Chinese). *Life Sci*, 2019, 31: 323–324 [邓子新. 合成生物学趁最好时代, 建物致知, 建物致用. *生命科学*, 2019, 31: 323–324]
 - 30 Gardner T S, Cantor C R, Collins J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403: 339–342
 - 31 Elowitz M B, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, 403: 335–338
 - 32 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
 - 33 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
 - 34 Malyshev D A, Dhami K, Laverne T, et al. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature*, 2014, 509: 385–388
 - 35 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
 - 36 Huang P S, Feldmeier K, Parmeggiani F, et al. *De novo* design of a four-fold symmetric TIM-barrel protein with atomic-level accuracy. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 29–34
 - 37 Boyken S E, Chen Z, Groves B, et al. *De novo* design of protein homo-oligomers with modular hydrogen-bond network-mediated specificity. *Science*, 2016, 352: 680–687
 - 38 Hsia Y, Bale J B, Gonen S, et al. Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron. *Nature*, 2016, 535: 136–139
 - 39 Bale J B, Gonen S, Liu Y, et al. Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. *Science*, 2016, 353: 389–394
 - 40 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
 - 41 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
 - 42 Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015, 349: 1095–1100
 - 43 National Academy of Engineering and National Research Council. Positioning Synthetic Biology to Meet the Challenges of the 21st Century: Summary Report of a Six Academies Symposium Series. Washington, DC: The National Academies Press, 2013
 - 44 Zhang X E. Preface to special issue of synthetic biology (2017) (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 311–314 [张先恩. 2017合成生物学专刊序言. *生物工程学报*, 2017, 33: 311–314]

- 45 The Royal Academy of Engineering. Synthetic Biology: Scope, Applications and Implications. 2009
- 46 The Royal Academy of Engineering. Synthetic Biology: Public Dialogue on Synthetic Biology. 2009
- 47 Hillson N, Caddick M, Cai Y, et al. Building a global alliance of biofoundries. *Nat Commun*, 2019, 10: 2040
- 48 Li C. Synthetic Biology (in Chinese). Beijing: Chemical Industry Press, 2019 [李春. 合成生物学. 北京: 化学工业出版社, 2019]
- 49 Xie Z X, Li B Z, Mitchell L A, et al. “Perfect” designer chromosome V and behavior of a ring derivative. *Science*, 2017, 355: eaaf4704
- 50 Shen Y, Wang Y, Chen T, et al. Deep functional analysis of synII, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome. *Science*, 2017, 355: eaaf4791
- 51 Wu Y, Li B Z, Zhao M, et al. Bug mapping and fitness testing of chemically synthesized chromosome X. *Science*, 2017, 355: eaaf4706
- 52 Zhang W, Zhao G, Luo Z, et al. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. *Science*, 2017, 355: eaaf3981
- 53 Shao Y, Lu N, Wu Z, et al. Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature*, 2018, 560: 331–335
- 54 Luo J, Sun X, Cormack B P, et al. Karyotype engineering by chromosome fusion leads to reproductive isolation in yeast. *Nature*, 2018, 560: 392–396
- 55 Zhang X E. Comments on single-chromosome yeast (in Chinese). *Front Sci*, 2019, 1: 17 [张先恩, 为“16合1”点赞. 前沿科学, 2019, 1: 17]
- 56 Boeke J D, Church G, Hessel A, et al. The genome project-write. *Science*, 2016, 353: 126–127
- 57 Ostrov N, Beal J, Ellis T, et al. Technological challenges and milestones for writing genomes. *Science*, 2019, 366: 310–312
- 58 Xue X, Wang T, Jiang P, et al. MEGA (multiple essential genes assembling) deletion and replacement method for genome reduction in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 700–706
- 59 Li J, Zhu X, Chen J, et al. Construction of a novel anaerobic pathway in *Escherichia coli* for propionate production. *BMC Biotechnol*, 2017, 17: 38
- 60 Zhou L, Ding Q, Jiang G Z, et al. Chromosome engineering of *Escherichia coli* for constitutive production of salvianic acid A. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 84
- 61 Liu R, Deng Z, Liu T. Streptomyces species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metab Eng*, 2018, 50: 74–84
- 62 Xu M J, Wang J H, Bu X L, et al. Deciphering the streamlined genome of *Streptomyces xiamenensis* 318 as the producer of the anti-fibrotic drug candidate xiamenmycin. *Sci Rep*, 2016, 6: 18977
- 63 Liu Y, Liu L, Li J, et al. Synthetic biology toolbox and chassis development in bacillus subtilis. *Trends Biotech*, 2018, 37: 548–562
- 64 Cui W, Han L, Suo F, et al. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34: 145
- 65 Li Y, Zhu X, Zhang X, et al. Characterization of genome-reduced *Bacillus subtilis* strains and their application for the production of guanosine and thymidine. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 94
- 66 Liu Q, Shi X, Song L, et al. CRISPR-Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 144
- 67 Ping Y, Li X, You W, et al. De novo production of the plant-derived tropine and pseudotropine in yeast. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 1257–1262
- 68 Shen X, Wang Z, Huang X, et al. Developing genome-reduced *Pseudomonas chlororaphis* strains for the production of secondary metabolites. *BMC Genomics*, 2017, 18: 715
- 69 Zhu D, Fu Y, Liu F, et al. Enhanced heterologous protein productivity by genome reduction in *Lactococcus lactis* NZ9000. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 1
- 70 Chen Y, Chen X Y, Du H T, et al. Chromosome engineering of the TCA cycle in *Halomonas bluephagenesis* for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate (PHBV). *Metab Eng*, 2019, 54: 69–82
- 71 Li S, Sun T, Xu C, et al. Development and optimization of genetic toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Metab Eng*, 2018, 48: 163–174
- 72 Tang Q, Lu T, Liu S J. Developing a synthetic biology toolkit for *Comamonas testosteroni*, an emerging cellular chassis for bioremediation. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 1753–1762
- 73 Li J, Mutanda I, Wang K, et al. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Nat Commun*, 2019, 10: 4850
- 74 Liu Y, Zeng Y, Liu L, et al. Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells. *Nat Commun*, 2014, 5: 5393
- 75 Liu Y, Zhan Y, Chen Z, et al. Directing cellular information flow via CRISPR signal conductors. *Nat Methods*, 2016, 13: 938–944
- 76 Huang H, Liu Y, Liao W, et al. Oncolytic adenovirus programmed by synthetic gene circuit for cancer immunotherapy. *Nat Commun*, 2019, 10:

4801

- 77 Si L, Xu H, Zhou X, et al. Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines. *Science*, 2016, 354: 1170–1173
- 78 Liu X, Kang F, Hu C, et al. A genetically encoded photosensitizer protein facilitates the rational design of a miniature photocatalytic CO₂-reducing enzyme. *Nat Chem*, 2018, 10: 1201–1206
- 79 Yang J, Xie X, Yang M, et al. Modular electron-transport chains from eukaryotic organelles function to support nitrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E2460–E2465
- 80 Vicente E J, Dean D R. Keeping the nitrogen-fixation dream alive. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 3009–3011
- 81 Yang J, Xie X, Xiang N, et al. Polyprotein strategy for stoichiometric assembly of nitrogen fixation components for synthetic biology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E8509–E8517
- 82 Burén S, López-Torrejón G, Rubio L M. Extreme bioengineering to meet the nitrogen challenge. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 8849–8851
- 83 Tan D, Xue Y S, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 8130–8136
- 84 Chen G Q, Jiang X R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr Opin Biotech*, 2018, 50: 94–100
- 85 Cui R, Liu H H, Xie H Y, et al. Living yeast cells as a controllable biosynthesizer for fluorescent quantum dots. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 2359–2364
- 86 Wang X, Pu J, An B, et al. Programming cells for dynamic assembly of inorganic nano-objects with spatiotemporal control. *Adv Mater*, 2018, 30: 1705968
- 87 Li F, Li Y X, Cao Y X, et al. Modular engineering to increase intracellular NAD(H⁺) promotes rate of extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis*. *Nat Commun*, 2018, 9: 3637
- 88 Zhu H, Meng H, Zhang W, et al. Development of a longevous two-species biophotovoltaics with constrained electron flow. *Nat Commun*, 2019, 10: 4282
- 89 Yan D Z, Liu H, Zhou N Y. Conversion of *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 to a hexachlorobenzene degrader by metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 2283–2286
- 90 Tang H Z, Wang W W, Zhang L G, et al. Application of synthetic biology in environmental remediation (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 506–515 [唐鸿志, 王伟伟, 张莉鹤, 等. 合成生物学在环境修复中的应用. *生物工程学报*. 2017, 33: 506–515]
- 91 Rothmund P W K. Design of DNA origami. In: *IEEE/ACM International Conference on Computer Aided-Design*. San Jose. 2005. New Jersey: IEEE, 2005. 471–478
- 92 Rothmund P W K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, 440: 297–302
- 93 Qian L, Wang Y, Zhang Z, et al. Analogic China map constructed by DNA (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2006, 51: 2860–2863 [钱璐璐, 汪颖, 张钊, 等. DNA纳米结构仿中国地图. *科学通报*, 2006, 51: 2860–2863]
- 94 Zhang Z, Zeng D, Ma H, et al. A DNA-origami chip platform for label-free SNP genotyping using toehold-mediated strand displacement. *Small*, 2010, 6: 1854–1858
- 95 Wu N, Zhou X, Czajkowsky D M, et al. *In situ* monitoring of single molecule binding reactions with time-lapse atomic force microscopy on functionalized DNA origami. *Nanoscale*, 2011, 3: 2481–2484
- 96 Fu Y, Zeng D, Chao J, et al. Single-step rapid assembly of DNA origami nanostructures for addressable nanoscale bioreactors. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 696–702
- 97 Li J, Fan C, Pei H, et al. Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures. *Adv Mater*, 2013, 25: 4386–4396
- 98 Wang D, Fu Y, Yan J, et al. Molecular logic gates on DNA origami nanostructures for microRNA diagnostics. *Anal Chem*, 2014, 86: 1932–1936
- 99 Zhang H, Chao J, Pan D, et al. DNA origami-based shape IDs for single-molecule nanomechanical genotyping. *Nat Commun*, 2017, 8: 14738
- 100 Sun L, Gao Y, Xu Y, et al. Real-time imaging of single-molecule enzyme cascade using a DNA origami raft. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 17525–17532
- 101 Liu X, Zhang F, Jing X, et al. Complex silica composite nanomaterials templated with DNA origami. *Nature*, 2018, 559: 593–598
- 102 Ge Z, Gu H, Li Q, et al. Concept and development of framework nucleic acids. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 17808–17819
- 103 Li F, Men D, Wang D B, et al. Synthetic of multi-dimensional nano biostructures and biodevices through self-assembly of biomacromolecules (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 404–421 [李峰, 门冬 王殿冰, 等. 生物大分子自组装合成多维纳米生物结构与器件. *生物工程学*

- 报, 2017, 33: 404–421]
- 104 Sun D, Zhuang X, Xiang X, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther*, 2010, 18: 1606–1614
- 105 Lakhal S, Wood M J A. Exosome nanotechnology: An emerging paradigm shift in drug delivery: Exploitation of exosome nanovesicles for systemic *in vivo* delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers. *Bioessays*, 2011, 33: 737–741
- 106 Huang L, Gu N, Zhang X E, et al. Light-inducible exosome-based vehicle for endogenous RNA loading and delivery to leukemia cells. *Adv Funct Mater*, 2019, 29: 1807189
- 107 Chen X, Zhang D, Su N, et al. Visualizing RNA dynamics in live cells with bright and stable fluorescent RNAs. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1287–1293
- 108 Wang X, Chen X, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods*, 2012, 9: 266–269
- 109 Hu C D, Chinenov Y, Kerppola T K. Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002, 9: 789–798
- 110 Zhang X E, Cui Z, Wang D. Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens Bioelectron*, 2016, 76: 243–250
- 111 Chen M, Liu S, Li W, et al. Three-fragment fluorescence complementation coupled with photoactivated localization microscopy for nanoscale imaging of ternary complexes. *ACS Nano*, 2016, 10: 8482–8490
- 112 Xue H, Shi H, Yu Z, et al. Design, construction, and characterization of a set of biosensors for aromatic compounds. *ACS Synth Biol*, 2014, 3: 1011–1014
- 113 Liang M, Li Z, Wang W, et al. A CRISPR-Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules. *Nat Commun*, 2019, 10: 3672
- 114 Li S, Zhou L, Yao Y, et al. A platform for the development of novel biosensors by configuring allosteric transcription factor recognition with amplified luminescent proximity homogeneous assays. *Chem Commun*, 2017, 53: 99–102
- 115 Yan X, Fan Y, Wei W, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast. *Cell Res*, 2014, 24: 770–773
- 116 Wang J, Li S, Xiong Z, et al. Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for de novo biosynthesis of steviolglycosides sweetener in *Escherichia coli*. *Cell Res*, 2016, 26: 258–261
- 117 Liu D, Liu H, Qi H, et al. Constructing yeast chimeric pathways to boost lipophilic terpene synthesis. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 724–733
- 118 Jiang G Z, Yao M D, Wang Y, et al. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2017, 41: 57–66
- 119 Li W, Xu R, Yan X, et al. *De novo* leaf and root transcriptome analysis to explore biosynthetic pathway of Celangulin V in *Celastrus angulatus* maxim. *BMC Genomics*, 2019, 20: 7
- 120 Wu J, Du G, Zhou J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metab Eng*, 2013, 16: 48–55
- 121 Liu X, Cheng J, Zhang G, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nat Commun*, 2018, 9: 448
- 122 Zhang Y, Wang Y, Yao M, et al. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnol Lett*, 2017, 39: 1033–1039
- 123 Xiong S, Wang Y, Yao M, et al. Cell foundry with high product specificity and catalytic activity for 21-deoxycortisol biotransformation. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 105
- 124 Zhou C, Li X, Zhou Z, et al. Comparative transcriptome analysis identifies genes involved in diosgenin biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum* L. *Molecules*, 2019, 24: 140
- 125 Yu Y, Tang B, Dai R, et al. Identification of the streptothricin and tunicamycin biosynthetic gene clusters by genome mining in *Streptomyces* sp. strain fd1-xmd. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 2621–2633
- 126 Zhao H, Wang L, Wan D, et al. Characterization of the aurantimycin biosynthetic gene cluster and enhancing its production by manipulating two pathway-specific activators in *Streptomyces aurantiacus* JA 4570. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 160
- 127 Zhuo J, Ma B, Xu J, et al. Reconstruction of a hybrid nucleoside antibiotic gene cluster based on scarless modification of large DNA fragments. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 968–979

- 128 Chen W, Dai D, Wang C, et al. Genetic dissection of the polyoxin building block-carbamoylpolyoxamic acid biosynthesis revealing the “pathway redundancy” in metabolic networks. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 121
- 129 Luo X, Reiter M A, d’Espaux L, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*, 2019, 567: 123–126
- 130 Chen W, Yao J, Meng J, et al. Promiscuous enzymatic activity-aided multiple-pathway network design for metabolic flux rearrangement in hydroxytyrosol biosynthesis. *Nat Commun*, 2019, 10: 960
- 131 Wang W, Li S, Li Z, et al. Harnessing the intracellular triacylglycerols for titer improvement of polyketides in *Streptomyces*. *Nat Biotechnol*, 2019, 361
- 132 Zhu F, Zhong X, Hu M, et al. *In vitro* reconstitution of mevalonate pathway and targeted engineering of farnesene overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111: 1396–1405
- 133 Fang H, Li D, Kang J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* biosynthesis of vitamin B12. *Nat Commun*, 2018, 9: 4917
- 134 Bai Y, Yin H, Bi H, et al. *De novo* biosynthesis of gastrodin in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 35: 138–147
- 135 Wang Y. New materia medica project: Synthetic biology based bioactive metabolites research in medicinal plant (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 478–485 [王勇. 新本草计划——基于合成生物学的药用植物活性代谢物研究. *生物工程学报*, 2017, 33: 478–485]
- 136 Zhang F, Carothers J M, Keasling J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 354–359
- 137 Guo X W, Zhang Y, Li L L, et al. Improved xylose tolerance and 2,3-butanediol production of *Klebsiella pneumoniae* by directed evolution of *rpoD* and the mechanisms revealed by transcriptomics. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 307
- 138 Liu H, Ni J, Xu P, et al. Enhancing light-driven 1,3-propanediol production by using natural compartmentalization of differentiated cells. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 2436–2446
- 139 Pan D T, Wang X D, Shi H Y, et al. Dynamic flux balance analysis for microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2018, 41: 1793–1805
- 140 Luo Y, Zhao Q, Liu Q, et al. An artificial biosynthetic pathway for 2-amino-1,3-propanediol production using metabolically engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 548–556
- 141 Zhao F, Bai P, Nan W, et al. A modular engineering strategy for high-level production of protopanaxadiol from ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *AIChE J*, 2019, 65: 866–874
- 142 Zhang C, Li M, Zhao G R, et al. Alpha-terpineol production from an engineered *Saccharomyces cerevisiae* cell factory. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 160
- 143 Cheng S, Liu X, Jiang G, et al. Orthogonal engineering of biosynthetic pathway for efficient production of limonene in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 968–975
- 144 Wang J, Qin D, Zhang B, et al. Fine-tuning of *ecaA* and *pepc* gene expression increases succinic acid production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 8575–8586
- 145 Zhao Y, Wang C S, Li F F, et al. Targeted optimization of central carbon metabolism for engineering succinate production in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 52
- 146 Yu Y, Zhu X, Xu H, et al. Construction of an energy-conserving glycerol utilization pathways for improving anaerobic succinate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2019, 56: 181–189
- 147 Li W, Ma L, Shen X, et al. Targeting metabolic driving and intermediate influx in lysine catabolism for high-level glutarate production. *Nat Commun*, 2019, 10: 3337
- 148 Yu J L, Xia X X, Zhong J J, et al. Direct biosynthesis of adipic acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111: 2580–2586
- 149 Li T, Guo Y Y, Qiao G Q, et al. Microbial synthesis of 5-aminolevulinic acid and its coproduction with polyhydroxybutyrate. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1264–1274
- 150 Zhang J, Kang Z, Chen J, et al. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 8584
- 151 Zhou J, Zhang H, Zhang Y, et al. Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium *Synechocystis* enables production of acetone from carbon dioxide. *Metab Eng*, 2012, 14: 394–400

- 152 Varman A M, Yu Y, You L, et al. Photoautotrophic production of D-lactic acid in an engineered cyanobacterium. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 117
- 153 Wang B, Pugh S, Nielsen D R, et al. Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO₂. *Metab Eng*, 2013, 16: 68–77
- 154 Yang X, Yuan Q, Luo H, et al. Systematic design and *in vitro* validation of novel one-carbon assimilation pathways. *Metab Eng*, 2019, 56: 142–153
- 155 Wen Z, Ledesma-Amaro R, Lin J, et al. Improved n-butanol production from *Clostridium cellulovorans* by integrated metabolic and evolutionary engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85
- 156 Minami H, Kim J S, Ikezawa N, et al. Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 7393–7398
- 157 Lin T, Bai X, Hu Y, et al. Synthetic *Saccharomyces cerevisiae*-*Shewanella oneidensis* consortium enables glucose-fed high-performance microbial fuel cell. *AIChE J*, 2017, 63: 1830–1838
- 158 Lim W A, Lee C M, Tang C. Design principles of regulatory networks: Searching for the molecular algorithms of the cell. *Mol Cell*, 2013, 49: 202–212
- 159 Ma W, Trusina A, El-Samad H, et al. Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation. *Cell*, 2009, 138: 760–773
- 160 Cao X Q. Tang Chao—A freedom explorer in the path of quantitative biology (in Chinese). *Sci Chin*. 2012, 23: 6–11 [曹雪琴. 汤超: 定量生物学路上的自由探索者. 科学中国人, 2012, 23: 6–11]
- 161 Wang S W, Tang L H. Emergence of collective oscillations in adaptive cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 5613
- 162 Zheng H, Ho P Y, Jiang M, et al. Interrogating the *Escherichia coli* cell cycle by cell dimension perturbations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 15000–15005
- 163 Wang X, Xia K, Yang X, et al. Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. *Nat Commun*, 2019, 10: 1279
- 164 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 165 Shu J, Wu C, Wu Y, et al. Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers. *Cell*, 2013, 153: 963–975
- 166 Yuan Y, Liu B, Xie P, et al. Model-guided quantitative analysis of microRNA-mediated regulation on competing endogenous RNAs using a synthetic gene circuit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3158–3163
- 167 Lin Z, Zhang Y, Wang J. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance. *Biotech Adv*, 2013, 31: 986–991
- 168 Basu S, Gerchman Y, Collins C H, et al. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, 2005, 434: 1130–1134
- 169 Cao Y, Ryser M D, Payne S, et al. Collective space-sensing coordinates pattern scaling in engineered bacteria. *Cell*, 2016, 165: 620–630
- 170 Liu C, Fu X, Liu L, et al. Sequential establishment of stripe patterns in an expanding cell population. *Science*, 2011, 334: 238–241
- 171 Fu X, Kato S, Long J, et al. Spatial self-organization resolves conflicts between individuality and collective migration. *Nat Commun*, 2018, 9: 2177
- 172 Liu W, Cremer J, Li D, et al. An evolutionarily stable strategy to colonize spatially extended habitats. *Nature*, 2019, 575: 664–668
- 173 Chen Z, Zhou W, Qiao S, et al. Highly accurate fluorogenic DNA sequencing with information theory-based error correction. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 1170–1178
- 174 Lee H H, Kalhor R, Goela N, et al. Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage. *Nat Commun*, 2019, 10: 2383
- 175 Palluk S, Arlow D H, de Rond T, et al. *De novo* DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 645–650
- 176 Perkel J M. The race for enzymatic DNA synthesis heats up. *Nature*, 2019, 566: 565
- 177 Luo Z Q, Dai J B. Synthetic genomics: The art of design and synthesis (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 1–12 [罗周卿, 戴俊彪. 合成基因组学: 设计与合成的艺术. 生物工程学报. 2017, 33: 1–12]
- 178 Ma Z S, Li L W, Ye C X, et al. Hybrid assembly of ultra-long nanopore reads augmented with 10x-genomics contigs: Demonstrated with a human genome. *Genomics*, 2019, 111: 1896–1901
- 179 Maxmen A. Synthetic yeast chromosomes help probe mysteries of evolution. *Nature*, 2017, 543: 298–299
- 180 Wei L, Yuan Y, Wang X W. Challenges in large-scale synthetic gene circuits design (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 1–14 [魏磊, 袁野, 汪小我. 合成基因线路规模化设计面临的挑战. 生物工程学报, 2017, 33: 1–14]

- 181 Jin S, Zong Y, Gao Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 2019, 36: eaaw7166
- 182 Zuo E, Sun Y, Wei W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019, 148: eaav9973
- 183 Zhou C, Sun Y, Yan R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature*, 2019, 571: 275–278
- 184 Choi G C G, Zhou P, Yuen C T L, et al. Combinatorial mutagenesis en masse optimizes the genome editing activities of SpCas9. *Nat Methods*, 2019, 16: 722–730
- 185 Liu W, Luo Z, Wang Y, et al. Rapid pathway prototyping and engineering using *in vitro* and *in vivo* synthetic genome SCRaMbLE-in methods. *Nat Commun*, 2018, 9: 1936
- 186 Luo Z, Wang L, Wang Y, et al. Identifying and characterizing SCRaMbLEd synthetic yeast using ReSCuES. *Nat Commun*, 2018, 9: 1930
- 187 Zhang W, Zhang X, Xue Z, et al. Probing the function of metazoan histones with a systematic library of H3 and H4 mutants. *Dev Cell*, 2019, 48: 406–419.e5
- 188 Zhang Y, Wang J, Wang Z, et al. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun*, 2019, 10: 1053
- 189 Qu L, Yi Z, Zhu S, et al. Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1380
- 190 Liu Q, Schumacher J, Wan X, et al. Orthogonality and burdens of heterologous AND gate gene circuits in *E. coli*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 553–564
- 191 Lynch M, Conery J S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 2000, 290: 1151–1155
- 192 Koga N, Tatsumi-Koga R, Liu G, et al. Principles for designing ideal protein structures. *Nature*, 2012, 491: 222–227
- 193 Chu H, Liu H. TetraBASE: A side chain-independent statistical energy for designing realistically packed protein backbones. *J Chem Inf Model*, 2018, 58: 430–442
- 194 Lu X, Liu Y, Yang Y, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design. *Nat Commun*, 2019, 10: 1378
- 195 Li R, Wijma H J, Song L, et al. Computational redesign of enzymes for regio- and enantioselective hydroamination. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 664–670
- 196 Wang Q, Cheng J, Jiang H F. Origin of new genes: From evolution to design (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 324–330 [王千, 程健, 江会峰. 新基因起源: 从自然进化到人工设计. *生物工程学报*, 2017, 33: 324–330]
- 197 Shipman S L, Nivala J, Macklis J D, et al. CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the genomes of a population of living bacteria. *Nature*, 2017, 547: 345–349
- 198 Zhang X E. New Needham's question: Can China lead the next round of scientific and technological revolution (in Chinese). *Outlook News*, 2009, 44: 40–41 [张先恩. 新李约瑟命题: 中国能否引领下一轮科技革命. *瞭望*, 2009, 44: 40–41]

Synthetic biology in China: Review and prospects

ZHANG Xian-En^{1,2}

*1 National Laboratory of Biomacromolecules, CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Institute of Biophysics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Synthetic biology is an emerging science and a typical convergence technology. On the basis of system biology, integrating the principles of engineering science and adopting bottom-up strategies, it aims to reveal the mechanism of life and to build a new generation of biotechnology, through designing and constructing new biological systems or redesigning the existing biological systems, which is therefore summarized in Chinese as “build-to-learn” and “build-to-use”. In early years, Chinese scientists were the first to artificially synthesize the functional protein (bovine insulin) and ribonucleic acid (yeast alanine tRNA). In recent years, they have been engaged in chromosomal synthesis and chromosomal engineering, genome editing, biological chassis construction, quantitative engineering biology, biological parts and gene circuits engineering, synthetic metabolism of natural products and organic chemical products, and enabling technologies (e.g. genome editing and computer simulation), and made a series of important discoveries and innovative achievements. These have given Chinese scientists an important role in the international consortium of synthetic biology. By the time to review 70 years’ development of science and technology in China, this article is to commemorate the pioneers and inspire the early career academics in the field, meanwhile discuss experiences and lessons, and identify future priorities and opportunities. Nowadays, synthetic biology is booming in the world, and Chinese scientists will be delighted to play vital role in it.

synthetic biology, chromosome engineering, genome editing, quantitative engineering biology, chassis cells, biological parts, gene circuits, synthetic metabolism, enabling technology, bioethics

doi: [10.1360/SSV-2019-0299](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0299)