

从人类基因组到人造生命：克雷格·文特尔领路生命科学

孙明伟^{1,3}, 李寅², 高福^{1,4}

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院微生物研究所 工业微生物与生物技术研究室, 北京 100101

3 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

4 中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101

摘要: 2010年5月20日, 美国 *Science* 杂志报道 J. Craig Venter 的研究小组制造了第一个能够自我复制的人工合成生命, 并立即引发了人们对这一研究潜在威胁的担忧和有关生物安全和生物伦理的讨论。但同时, 这一成果也是人类在合成生物学领域的一次突破。我们相信在后基因组时代, 合成生物学的发展必将广泛地应用于能源、环境、材料、医药等诸多领域, 从而影响和改变人类未来的生活。

关键词: 人造生命, 克雷格·文特尔, 人类基因组计划, 合成生物学

From human genome to man-made life: J. Craig Venter leads the life sciences

Mingwei Sun^{1,3}, Yin Li², and George F. Gao^{1,4}

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 College of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

4 Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: For the first time ever, the scientists of J. Craig Venter team have created actual self-replicating synthetic life. The research was just published in the *Journal of Science* on May 20, 2010. Although this news immediately brings the worry about the possible potential threat to biosecurity and biosafety as well as the ethical disputes, it yet indicates that mankind have made a new step forward in synthetic biology. In the time of post-genome era, we believe the advancement of synthetic biology that might affect or change the future life of human being will be widely used in energy, environment, materials, medication and many other fields.

Keywords: artificial life, Craig Venter, Human Genome Project, synthetic biology

自人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 完成以后, 生命科学进入“后基因组时代”, 生物信息学、计算生物学、系统生物学以及合成生物学等崭新学科不断出现, 并得到快速发展。前不

久, 首个“具有人造 DNA 的活细胞”在 J. Craig Venter 的研究所横空出世, 该成果一经报道立即引起了科学界、哲学界的轰动, 合成生物学这一新兴学科也因此再次引起了人们的高度关注。

Received: June 12, 2010; **Accepted:** June 17, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China for Distinguished Young Investigator (No. 30525010).

Corresponding author: George F. Gao. Tel: +86-10-64807688; Fax: +86-10-64807882; E-mail: gaof@im.ac.cn

国家自然科学基金委员会杰出青年科学基金 (No. 30525010) 资助。

1 2010年夏天的“爆炸”新闻

2010年5月20日, J. Craig Venter 私立研究所 (J. Craig Venter Institute) 的一个 20 多人的科研小组在美国 *Science* 杂志上报道了首例人造细胞的诞生。这是一个山羊支原体 *Mycoplasma capricolum* 细胞, 但细胞中的遗传物质却是依照另一个物种即蕈状支原体 *Mycoplasma mycoides* 的基因组人工合成而来, 产生的人造细胞表现出的是后者的生命特性^[1]。这是地球上第一个由人类制造并能够自我复制的新物种。Craig Venter 的团队将这一人造细胞称作“Synthia”(意为: 合成体)。

回顾 Venter 团队制造人造细胞的研究历程, 这项工作早在 1995 年就开始了。在 2007 年, Venter

团队就已经掌握了在这两种支原体中进行基因组转移的技术, 只不过当时的操作对象是蕈状支原体内的天然 DNA^[2]。2008 年 2 月, Venter 团队又成功地合成了另一种原核生物——生殖支原体 *Mycoplasma genitalium* 的基因组 DNA^[3]。今天举世瞩目的人造细胞“Synthia”就是将以上两种技术合而为一的结果。

支原体是目前发现的最小、最简单的具有自我繁殖能力的细胞, 其基因组也是原核生物中最小的, 因此便于操作。尽管 Venter 团队已经能够合成生殖支原体的基因组, 但由于生殖支原体生长极其缓慢, 因此研究者选择了生长较快的蕈状支原体和山羊支原体作为实验对象, 分以下 4 个步骤完成实验 (图 1)。

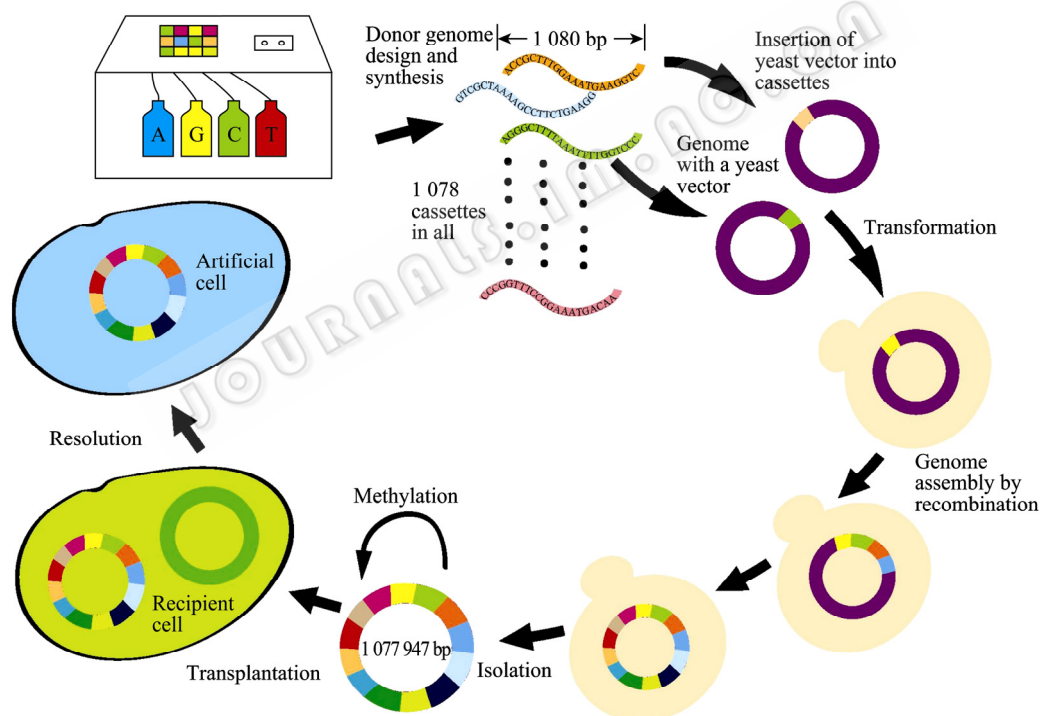


图 1 文特尔多造生命合成示意图
Fig. 1 The man-made life of Venter's.

1) 合成供体的基因组 DNA: 首先, 将蕈状支原体的全基因组测序, 并按照该序列信息将其合成为 1 078 条平均长度为 1 080 bp 的 DNA 片段。这些片段两两间具有 80 bp 的部分重叠, 所有片段拼接起来构成蕈状支原体的全长基因组。值得注意的是这些合成的片段较天然基因组略有一些改动, 包括去除了 14 个不重要的基因、为阻断基因而设计的两

个插入序列、27 处单核苷酸多态性 (其中 19 处在意料之中) 以及 4 条用来区分于天然序列模本的“水印”标记 (Watermark), 这些改动都不影响细胞正常的生命活动。该过程涉及到计算机对合成序列的精密计算。2) 合成 DNA 片段的拼接: 将以上合成的 1 078 条 DNA 片段分别连接到载体, 使其能在酵母细胞中通过同源重组拼接起来。于是, 平均 1 080 bp

的 DNA 片段, 10 个一组拼接为大约 10 kb 的片段 (109 个), 然后将这些连接有目的基因片段的载体从酵母中分离出来, 转入大肠杆菌 *E. coli* 中进行扩增, 以限制酶筛选出阳性克隆; 之后再将阳性克隆质粒中的这 109 条 10 kb 左右的片段按同样的方法每组 10 个拼接成 100 kb 的片段 (11 个); 这 11 条片段最终拼接成完整的总共 1 077 947 bp 的基因组 (由于携带太大片段的载体在 *E. coli* 中不能稳定传代, 因此后两步拼接中采用多重 PCR 来筛选阳性克隆)。此过程除了 2 个衔接反应是在体外用酶处理构建, 其余所有的片段都是在酵母细胞内依靠同源重组拼接而成。3) 人工基因组的甲基化修饰: 由于供体细胞 (蕈状支原体) 和受体细胞 (山羊支原体) 共用同一套限制酶系统, 而天然的供体基因组是经甲基化修饰的。因此, 拼接完成的基因组 DNA 还需在体外用甲基化酶 (从蕈状支原体或山羊支原体提取物中纯化) 进行修饰, 以避免受体细胞限制酶系统的阻碍。4) 人工基因组移植入受体细胞: 将构建好的人工合成基因组移植入山羊支原体内。细胞经过不断分裂传代, 具有人造基因组的细胞在含抗生素的培养基中筛选出来, 同时含有天然 DNA 的细胞逐渐消失殆尽。最终只剩下含有山羊支原体细胞质但由合成 DNA 控制的人工嵌合体细胞。虽然蕈状支原体和山羊支原体在基因组上 75% 是同源的, 但该人造细胞明显表现出蕈状支原体的生长特性。

其实, 嵌合体细胞应用遗传工程手段早已实现。而 Venter 的“人造细胞”也只是遗传物质由人工合成, 其他组分均来自于已有的生命形式。因此, 一些媒体采用“首个人造生命”的说法言之过甚。相反, Venter 等人在 *Science* 上的文章题目“创造由化学合成基因组控制的细菌细胞”更为严谨、客观。但是无论如何, 这项孕育 15 年、耗资 4 000 万美元的科技成果, 毕竟是生命科学发展的重大进步, 在合成生物学发展史上具有里程碑意义。

2 Craig Venter 挑战人类基因组计划

John Craig Venter 出生于 1946 年, 曾应征加入美国海军医疗队参加越战, 越南战场的残酷使他认识到时间和生命的宝贵, “人生的每一分钟都应该有

所创新”。回国后, Venter 仅用了 6 年时间先后就读于圣马特奥学院 (College of San Mateo) 和加州大学圣迭戈分校 (UC San Diego), 并在后者获得了生物化学学士学位和生理学及药理学的博士学位, 从此开始了他的学术生涯。

2.1 国际人类基因组计划与“霰弹枪测序法”

1984 年, 在一个由美国能源部资助的旨在讨论日益发展的 DNA 重组技术的会议上, 科学家们第一次讨论了人类基因组测序的应用价值^[4]。这一年, Venter 进入了美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH), 从事细胞表面受体研究。在这期间 Venter 逐渐对基因组研究产生浓厚兴趣。1986 年, *Nature* 杂志上报道了 Smith 等发明的一种 DNA 序列自动分析技术^[5], Venter 立刻与发明人取得联系。几个月后, Venter 便拥有了当时 NIH 的第一台自动基因测序仪。而又是在这一年, 诺贝尔奖得主 Renato Dulbecco 在 *Science* 杂志文章中强调人类基因组测序对治愈癌症和肿瘤的巨大作用^[6], 同时 Robert Sinsheimer 等也首次对于人类基因组测序的可行性进行了深刻探讨, 使得美国能源部决定对人类基因组启动计划资助 530 万美元^[7-8]。1988 年, 诺贝尔生理学或医学奖得主、DNA 双螺旋结构的发现者 James D. Watson 着手领导在 NIH 成立的美国国家人类基因组研究中心 (National Human Genome Research Institute, NHGRI), Venter 便作为其中的一员加入了这项计划。1990 年, 号称“30 亿美元, 30 亿个碱基对”的人类基因组计划由美国能源部和 NIH 正式启动, 预期 15 年内完成对人体 10 万个基因的解码, 绘制出人类基因组图谱。之后, 英、法、德、日、印等国相继加入, 我国也在 1999 年 9 月正式加入人类基因组计划并承担 1% 的测序工作。人类基因组计划成为了一项国际间合作的科研计划。

当时, 大量的人类基因组测序工作所采用的是“链终止法”或称“末端终止法”, 即先将大片的 DNA 分子用限制酶切成小的片段作为 PCR 模板, 再在每组 PCR 体系中按一定比例掺入一种 2',3' 双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP), 该化合物的加入将会使得 DNA 合成终止。经过 4 组反应 (对应 4 种 ddNTP) 后, 各种不同大小的片段末端即为该种核苷酸。再

通过变性胶电泳, 最终在自显影图上读出相应的 DNA 序列^[9]。“链终止法”虽然能够准确地读取特定 DNA 片段的序列, 但该方法应用于基因组测序也存在着很多弊端: 首先, 该方法只能处理碱基数目较少的 DNA, 无法应付如人类基因组这般由上亿个碱基对构成的 DNA 库。可想而知, 如果要将其用限制酶切割成小的片段——进行末端测序, 最终的工作量将是惊人的。其次, 该方法还需要大量完全相同的 DNA 拷贝, 因此在测序前要构建人工染色体, 并在细菌中“克隆扩增”, 以增加目的片段的拷贝数。这样无形中也加大了整项测序工作的成本和时间。因此这项跨世纪的计划不仅耗资巨大, 而且需要各国大量的人力、物力的共同参与方可完成。当时在 NIH 参与工作的 Venter 也认为用传统的“链终止法”的测序效率实在太低, 他提出一种更为简单快捷的测序方法: 将基因组打断为数百万个 DNA 片段, 并对每个片段进行末端测序, 然后应用一定算法的计算机程序将具有相同末端序列的片段重新整合拼接在一起, 从而得到整个基因组序列。该方法称为霰弹枪测序法 (Shotgun sequencing), 俗称“鸟枪法”。但此提议却遭到 NIH 的研究者的一致反对。他们认为人类的染色体在端粒和着丝点处有着大量重复的序列, 应用“鸟枪法”进行测序时, 这些高度重复的序列会导致程序计算出错误的结果。对于人类如此复杂的生命机体而言, 该方法的精确性有待商榷。尽管 Venter 四处游说, 但仍然无法为他的这一方法获得公共资金支持, 这让他颇为沮丧。

1992 年, Craig Venter 在马里兰州的罗克维尔成立了他的第一家非盈利的基因组研究机构——TIGR (The Institute for Genomic Research)。三年后, Venter 所领导的 TIGR 研究所完成了第一个单细胞自由生物流感嗜血杆菌 *Haemophilus influenzae* Rd 的全基因组序列测定^[10]。当时 TIGR 使用了 14 台测序仪, 仅 3 个月的时间就完成了必需的 28 463 个测序反应, 从而验证了霰弹枪测序法, 同时也让 NIH 的官员感到颇为难堪。1996 年, 他们又第一个完成了具有最小基因组的单细胞生物生殖支原体 *Mycoplasma genitalium*^[11] 以及詹氏甲烷球菌 *Methanococcus jannaschii* 的全基因组测定^[12], 再一次证明了自己的

实力。

2.2 Craig Venter 的人类基因组计划

国际人类基因组计划启动 8 年后的 1998 年, 在 PerkinElmer 公司 3.3 亿美元 (仅是国际计划的 1/10) 的投资下, Venter 又建立了名为塞雷拉基因组 (Celera Genomics) 的私立公司, 正式开始自己的人类基因组计划。他坚定地采用快速但颇具风险的霰弹枪测序法, 并声称要在 3 年内完成人类基因组的序列测定。此时, 由政府支持的人类基因组测序工作已经花了 8 年时间, 但仅仅测定了基因组的 3%。虽然科学家们对 Venter 的“狂言”表示怀疑, 但当时 Francis Collins 领导的美国国家人类基因组研究所还是因此加快了研究进度。遗憾的是, 面对 Venter 这样一个科学奇才, 他们的努力仍然望尘莫及。2000 年 4 月 6 日, Venter 的研究小组向全世界宣布他们已经完成了人类基因组的测序工作。然而, 他们拒绝将得到的数据和全人类共享, 也禁止他人自由发布或无偿使用他们得到的基因数据, 而且他们已经将人类的 6 500 个基因申请专利保护, 这对于国际基因组联盟来说无疑是当头一棒。最终美国总统克林顿和英国首相布莱尔联合发表声明称人类基因组数据不允许专利保护, 且必须对所有研究者公开, 才使得人类基因组图谱这一全人类的财富没有变成私有。不久, 国际基因组联盟也完成了人类基因组工作草图的绘制。

2000 年 6 月 26 日, 美国总统克林顿等六国领导人共同宣布人类基因组计划的草图完成。虽然, Venter 为基因申请专利的举动不能被接受, 但也正是由于他的贡献, 使得预计 15 年才能完成的工作, 提前 3 年便得已竣工。2001 年 2 月国际人类基因组测序联盟和 Venter 在 Celera 公司的研究团队的人类基因组工作草图的具体序列信息、测序方法以及序列的分析结果分别发表于 *Nature* 与 *Science* 杂志^[13-14]。Craig Venter 和人类基因组研究所所长 Francis Collins 一起分享了当年 A&E Network 颁发的生物年度奖 (Biography of the Year)。

Venter 的成功, 也是他的创新点就在于计算机技术的运用: Venter 用计算机程序模拟基因定序, 而不再通过手工操作测序。这样就可以将一个细胞

的所有基因分成无数个 DNA 片段, 提供给测序机“解码”。再通过相应的程序算法处理由此产生的琐碎数据, 并把解读的“密码”一步步拼接成完整的基因组序列。大量工作交给计算机后, 极大地提高了测序工作的效率。“传统基因技术用数十年才能完成的工程缩减到数月、数周, 甚至数天完成”, 就连对 Venter 批评很多的诺贝尔奖得主 James Watson 也不得不承认他的发现是“科学上的伟大时刻”。

在人类基因组测序的竞争中, 研究人员表现出了令人难以置信的凝聚力、专注和惊人的速度。今年 4 月 *Nature* 杂志发表专刊《人类基因组十年记》^[15]。5 月 21 日“首个单细胞生命”在 Venter 手中诞生。这一历史性突破, 可以说是对“人类基因组计划完成十周年”的最好纪念, 同时也是进入“后基因组时代”的十年来生命科学迅速发展的最精彩的诠释。

3 早期的合成生物学及中国的贡献

如果说 Craig Venter 是国际上率先解读人类基因组的研究者之一, 那么在合成生物学领域他绝对是世界上“制造”能够自我复制的细胞基因组的第一人。人造细胞“Synthia”的诞生, 让 Craig Venter 又一次站在了全世界的聚光灯下。但如果从广义的角度解读“合成人工生命”, Venter 的工作还谈不上是“首次”。

2002 年, 纽约州立大学 Wimmer 小组的 Cello 等人制造了历史上第一个人工合成的病毒——脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus)。这是一种单股正链 RNA 病毒, 病毒侵入细胞后, RNA 在病毒蛋白、RNA 依赖的聚合酶以及其他相关蛋白的帮助下, 转录为负链, 并以此作为模板合成新的病毒基因组。该研究小组则按照相反的方向, 用化学方法合成了与病毒基因组 RNA 互补的 cDNA, 使其在体外 RNA 聚合酶的作用下转录成病毒的 RNA, 并且在无细胞培养液中翻译并复制, 最终重新装配成具有侵染能力的脊灰病毒^[16]。若将这种合成的病毒注射到小鼠体内可使其脊椎麻痹, 甚至死亡。但该种合成病毒的毒力很小, 仅相当于天然病毒的一千到一万分之一。这一工作开创了以无生命的化合物合成感染性病毒的先河。

2003 年, Hamilton O. Smith 和 Craig Venter 仅用了两周时间便合成了噬菌体 ϕ X174 的基因组, 该病毒只有 11 个基因 (5 386 bp), 但将合成的基因组 DNA 注入宿主细胞时, 宿主细胞的反应和感染了真正的 ϕ X174 噬菌体的细胞一样^[17-18]。

2008 年, Becker 等设计并合成了蝙蝠体内的 SARS 样冠状病毒基因组, 并将该基因组中受体结合结构域 (Receptor-binding domain, RBD) 替换为之前流行的 SARS 病毒的 RBD, 并成功感染了培养的人呼吸道上皮细胞 (HAE) 以及小鼠。这一 29.7 kb 的 RNA 序列是当时合成的最大的可以自我复制的基因组^[19]。

之后 Venter 又将挑战目标指向原核生物。2007 年 8 月, 他的团队已经能够将草支原体的整个基因组分离为“裸露”的 DNA 并将其移植到山羊支原体中, 实现了不同物种间的基因组转输^[2]。之后 Venter 又率领一个 17 人小组首次尝试人工合成细胞基因组, 最终在 2008 年成功地利用酵母细胞的同源重组完成了生殖支原体的全基因组合成, 创造了当时世界上最大的人工合成的 DNA 组织 (582 970 个碱基对)^[3,20]。

科学界对于人造生命的实践还是从本世纪初才兴起的。而上个世纪 60 年代就开始的对于核酸和蛋白质等有机物的人工合成也为人们后来尝试合成生命奠定了基础。这也要归功于中国在合成生物学方面的贡献: 1965 年 9 月 17 日, 我国人工合成了结晶牛胰岛素, 这是世界上首次人工合成蛋白质, 也是当时人工合成的具有生物活力的最大的天然有机化合物^[21-23]。在 1979 年 Khorana 等合成酪氨酸阻遏 tRNA^[24]之后, 中国科学院上海生化研究所王德宝等历时 13 年, 经过千百次的探寻和摸索, 在世界上最早用人工方法合成了具有与天然分子相同化学结构和完整生物活性的核糖核酸——酵母丙氨酸转移核糖核酸 (Yeast alanine tRNA)。这种核糖核酸由 76 个核苷酸组成, 其中除了 4 种常见的核苷酸外, 还有 7 种稀有的核苷酸。利用化学和酶促相结合的方法, 研究者自行制备出了 11 种核苷酸、近 10 种核糖核酸工具酶和有关的化学试剂等, 并采取有机化学和酶促合成的方法, 先合成了几十个长度为 2~8

个核苷酸的寡核苷酸链,然后用 T4 RNA 连接酶连接成 6 个大片段 (长度为 9~19 个核苷酸),然后分别接成含有 35 和 41 个核苷酸的两个半分子。最后终于在 1981 年 11 月 20 日完成了最后的合成,以后又进行了 5 次重复合成试验,均获得了成功。在人类探索生命科学的道路上迈出了重要的一步^[25-26]。

“Synthia”的问世,似乎让人们觉得当年震惊世界的科学奇才 Venter 一下子又在实验室中制造出世上没有的人工生命。其实不然,虽然 Venter 以其过人的智慧在基因组与合成生物学领域走在世界前列,但人造生命的产生也并非一日之功。前人在生物合成以及人造病毒等方面的工作,为 Venter 在合成支原体细胞提供了丰富的依据和经验。而且,Venter 也是在自己先前合成生殖支原体基因组以及天然基因组种间移植的工作基础上,经过大量实验,反复摸索,才在 2 年之后获得成功^[27]。因此,人造生命的出现并非偶然。

4 合成生物学的贡献和困扰

4.1 合成生物学的概念与意义

合成生物学 (Synthetic biology) 是一门建立在系统生物学、生物信息学等学科基础之上,并以基因组技术为核心的现代生物科学。

合成生物学一词最早出现于 1911 年的 *The Lancet* 杂志^[28],但许多学者认为合成生物学成为一门真正的学科开始于 2000 年^[29-31]。进入后基因组时代以后,集成系统生物学思想的合成生物学应运而生,它综合了生物化学、生物物理和生物信息等技术,利用基因和基因组的基本要素及其组合,设计、改造、重构或是创造生物分子、生物体部件、生物反应系统、代谢途径与网络乃至具有生命活力的生物个体。目前的合成生物学研究可以笼统分为两大类:一类是以创造人造生命为目的,利用非天然的分子再现自然生物体的天然特性;另外一类则是力求分离自然生物体中的一部分并将其重构到具有非天然机能的生物系统当中,这种包含了天然成分的合成又叫半合成生物学。无论哪种类型,都推动着科学家们深入以往未知的领域,并可能遇到以前很难遇到的问题和困难,最终通过分析解决这些问题是所有合成生

物学工作者的共同目标^[32]。

合成生物学的研究既是生命科学和生物技术在分子生物学和基因工程水平上的自然延伸,又是在系统生物学和基因组综合工程技术层次上的整合性发展。其目的在于设计和构建工程化的生物体系,使其能够处理信息、加工化合物、制造材料、生产能源、提供食物、处理污染等。从而增强人类的健康,改善生存的环境,以应对人类社会发 展所面临的严峻挑战。

4.2 人造生命的技术困扰和挑战

合成生物学是后基因组时代生命科学研究的新兴领域。早在本世纪初,它就已经成为现代生命科学研究热点。然而,“合成生物学”第一次真正进入大众视野,还是缘于这次“世界首个人造生命”的新闻事件。本次合成的支原体细胞较以前无论是病毒还是噬菌体基因组都要大出很多倍,Venter 等工作首次将合成生命的对象推广到原核生物,实现了合成生物学在细胞基因组水平的突破。

殊不知,虽然本次实验的最终产品是支原体细胞,但真核酵母却是这场表演的真正主角。目前的 DNA 合成技术还不能一次得到很长的序列片段,Venter 小组合成的蕈状支原体的 DNA,也是将整个基因组截成 1 078 条 DNA 片段来合成,然后把它们插入酵母细胞中,利用酵母中具有超强 DNA 修复功能的酶,将平均长度为 1 080 bp 的 DNA 片段拼接成 1 077 947 bp 的全长基因组。

因此准确地说,人造细胞“Synthia”唯一非天然的部分便是它依照蕈状支原体合成的基因组,但这 1 000 多 kb 的 DNA,如果不是借助酵母的细胞环境,仅靠化学合成仍然是不能完成的。这也是目前人造生命主要的技术困扰之一:人工合成生命体的遗传物质在体外无法达到细胞基因组水平的最小长度;而且这些化学合成的“核酸”也并不一定能在细胞中稳定地复制传代并指导生命活动,所以更谈不上仅依靠这些化合物从头产生有生命的个体。另外 Venter 的小组合成的基因组也并非绝对的凭空“创造”。无论是 2 年前合成的生殖支原体基因组,还是这一次的蕈状支原体人造基因,除了几处极少的改动外,基本等同于这些天然细胞的基因序列。

总之, 目前的人造生命不可能完全脱离其天然范本和细胞环境。

在后基因组时代, 基因测序和 DNA 合成技术虽然日臻成熟, 且成本也越来越低。但人造生命或者其他合成生物学的研究仍然没有想象中简单。就以“Synthia”的产生过程为例, 当正确的 DNA 序列移入到受体 (山羊支原体) 后却不正常工作。最终 Venter 他们还是通过甲基化酶的 DNA 修饰才克服了受体细胞的限制性。由于表观遗传学所涉及的各种因素, 往往序列正确的 DNA 组装成结构正确的染色体后还是会在胞内发生沉默; 外源基因的插入还可能造成细胞原有代谢途径的改变, 从而影响到正常生命活动的进行。另外, 生命系统的复杂多变、系统中各部件的功能尚不明朗, 这些都成为合成生物学研究的技术困扰与发展制约^[33]。同时这也正是人类基因组破译 10 年后, 其研究成果不能直接应用于医疗的具体原因之一^[15]。

4.3 生物安全与生物伦理

合成生物学研究只有突破各种技术壁垒和制约瓶颈, 才能最终蓬勃发展起来。作为以系统生物学为基础的一门新兴学科, 捷报频传的成果已经说明了合成生物学巨大的生命力和广阔应用前景, 未来随着自然科学的飞速发展和合成生物学技术的不断进步, 一定可以实现对微生物乃至高等动植物进行定向改造, 甚至直接制造出世界上不存在的生命个体。但随之而来的生物伦理和生物安全等备受关注的问题又令一些学者望而却步。如同 30 多年前的 DNA 重组技术是否会对人类健康造成威胁的问题一样, 一些必须面对的社会问题也困扰着合成生物学家们。2004 年 6 月在美国麻省理工学院 (MIT) 举行的第一届合成生物学国际会议上除了涉及合成生物学的科学与技术问题外, 还讨论了这一学科当前与未来的生物学风险、有关伦理学问题以及知识产权问题。随着这个领域的发展, 对于合成生物学的安全性的考虑越来越多。人们所担心的正是对这些人造合成的微生物有意或无意的误用, 让一些具有致病感染性的病菌威胁人类和其他生物的安全^[34]; 或者在实验室中制造出未经自然选择而产生的物种, 而这些生物的某些特性很可能影响到生态环境,

破坏生态平衡, 这些危害一旦发生后果将是难以预知和控制的^[35]。倘若合成生物技术被应用于制造生物武器, 更会让人感到异常恐惧。但另一方面, 合成生物学的贡献和前景已是有目共睹, 合理开展合成生物学研究, 将极大地推动经济与社会的发展。一味地逃避风险而停下探索的脚步无异于因噎废食。当然, 在进行各种类型的研究之前, 一定的监督和对价值与风险的评估都是必要的^[36]。这样才能使这一学科向着对全人类有益的方向发展; 在未来才会有更多生命科学的发明创造在能源、环境、资源、健康等领域得到应用。这些应用才是科学家开创合成生物学的真正初衷, 也是合成生物学本身的意义所在。

另外, 合成生物学的发展过程也一直伴随着有关伦理道德的争论。一些宗教组织还认为生物合成无异于扮演上帝造物, 有悖自然伦理。其实不然, 类似于基因重组这样的工作几乎每天都发生在任何一个分子生物学实验室中。况且, 一些致病的病毒和细菌同样是自然界的产物, 而人类却一直为消灭它们而进行着斗争。天花病毒早已灭绝, 脊髓灰质炎病毒也几近绝迹, 没有什么比这更像在充当上帝的角色, 但也不会有哪个理智的人对此感到遗憾。另外, 合成生物学远没有发展到可以任意创造生命的程度。“任意创造生命”既不是目前合成生物学发展水平所能及, 也不是发展该学科的最终意义。诺贝尔和平奖获得者 Schweitzer 医生曾经写到“我必须坚持这样一个事实: 生命意识透过我展示了她自己, 成为与其他生命意识相互依存的一员”。人们不该因为肤浅的信条而削减了认识自然与追求真理的动力。感受和领悟“生命之美”恰恰是每一个生命科学工作者的理想与责任。但同时, 对生物伦理的担心与讨论也值得被重视, 相关的观点也应该受到尊重。

5 展望

当生命科学进入后基因组时代的第 10 年, 合成生物学也在 Craig Venter 等人的一个个创新与突破中走过了 10 个年头。今天, “人造细胞”的成功见证了合成生物学领域由无机到有机, 从基因组到细

胞的又一次飞越。让人不禁感叹现代生物科技的高度发达。这一研究成果与其说是人类征服自然过程中的一次胜利,不如说是自然赋予我们的又一新知。

系统生物学的发展使人们对生物系统的认识逐渐加深。随着基因组数据库的日益丰富,生物信息学、基因与蛋白质组学等领域的进步,新的技术方法、更高的效率以及更低的成本将推动合成生物学在更多学科和领域中实现从局部向整体、由分散到系统的多元化发展。合成生物学有着巨大的社会效益及经济价值,必将在能源、环境、化工、材料、医药等领域得到广泛应用。但是,目前的合成生物学仍然有很多思想上和技术上的困难要克服。Craig Venter 的挑战与创新精神正是未来所需要的。生物合成已不仅仅是一个科学问题,更是一个人类问题与社会问题。

在生命科学飞速发展的 21 世纪,科技进步需要积极、合理并有预见性地融入合成生物学的研究方法。唯有这样,合成生物学这把“双刃剑”才能真正成为人类认识世界和征服世界的利器;人们的未来生活才能最大程度地受益于生命科学的探索成果。合成生物学的潜能是巨大的:人造器官、廉价高效的药物生产、清洁并可持续的生物能源……这些美好的前景需要的是耐心和努力,以及一大批科学家和工程师们的创新与探索^[29]。因此,合成生物学任重而道远。

附录 合成生物学大事记

1828 年, Wohler 利用氰酸铵合成尿素^[37]。

1953 年, Miller 通过放电合成氨基酸,模拟原始地球的有机物发生过程^[38]。

1965 年 9 月 17 日,中国合成了第一个人工合成的蛋白质——结晶牛胰岛素^[21-22]。

1968 年, Khorana 等合成了核苷酸及基因密码子^[39]。

1970 年, Khorana 等首次用化学方法人工合成了有 77 个核苷酸对的酵母丙氨酸的结构基因^[40]。

1972 年, Price 和 Conover 等的实验室各自用反向转录酶合成了家兔和人的珠蛋白基因,这是首次合成真核生物的基因^[41]。

1973 年 8 月, Khorana 等又合成了具有 126 个核苷酸对的大肠杆菌酪氨酸 tRNA 基因,但并没有转录功能^[42]。

1973 年 11 月, Stanley Cohen 和 Herbert Boyle 等精确地把基因或者 DNA 片段插入其他细胞中,从而建立了重组 DNA 技术^[43-44]。

1977 年,美国加州大学的 Boyer 等用化学方法合成了人生长激素抑制因子的基因^[45]。

1979 年, Khorana 等合成了酪氨酸阻遏 tRNA 以及酪氨酸 tRNA 基因^[24,46]。

1981 年 11 月 20 日,中国合成酵母丙氨酸转移核糖核酸^[25-26]。

2000 年 1 月, Gardner 等在大肠杆菌中构建了基因开关 (Toggle switch),一个合成的双稳态基因调控网络^[31]。Elowitz 等构建了第一个合成的生物振荡器——压缩振荡子 (Repressilator)^[30]。这两项事件标志着合成生物学作为一项新的领域正式产生。

2000 年 11 月, Brenner 等设计向细胞 DNA 中参入天然不存在的碱基的方法来发展人工遗传系统,支持人工生命形式^[47]。

2001 年, Schultz 实验室向大肠杆菌蛋白质生物合成装置中添入新的组分 (tRNA/氨酰-tRNA 合成酶组合),使之能通过基因生成非天然的氨基酸^[48]。

2002 年 8 月, Cello 等制造了第一个人工合成的病毒——脊髓灰质炎病毒^[16]。

2003 年 7 月, Keasling 等在美国劳伦斯伯克利国家实验室设立合成生物学部,并在大肠杆菌中成功地建立了合成青蒿素的网络,使得青蒿素价格降低到原来的 1/10^[49]。

2003 年 8 月, Schultz 实验室又发明了一种向酵母中加入非天然氨基酸密码子的方法,成功地向蛋白质中导入了 5 种氨基酸^[50]。

2003 年 12 月, Craig Venter 等合成了噬菌体 ϕ X174 的基因组^[18]。

2004 年 6 月,第一届合成生物学国际会议在美国麻省理工学院召开。

2004 年 10 月,美国、加拿大与日本的学者合作将收集到的 1918 年西班牙流感病毒的 DNA 片段进行分析,并据此人工合成了该株流感病毒编码 HA 和 NA 蛋白的基因,进而获得了新的流感病毒。该病毒表现出与西班牙亚型流感病毒相近的致病性^[51]。

2004 年 12 月, Libchaber 领导的研究小组尝试创造了一个模拟人造生物——“囊生物反应器”(Vesicle bioreactors),其组成部分来自不同的生物材料:由蛋清中的脂肪分子和大肠杆菌细胞提取物组成。“囊生物”内的基因可控制合成 α -溶血素 (α -hemolysin)^[52]。

2005年8月19日,美国旧金山举行了合成生物学会议,讨论了合成生物学在药物开发、细胞编程和生物机器人方面的潜在应用,以及随之而来的生物安全、伦理、法律等问题。

2005年11月,麻省理工学院的研究人员在 *E. coli* 中加入一个合成的传感器激酶,使细菌能对不同光照条件作出应答^[53]。

2006年,Keasling 实验室将多个青蒿素生物合成基因导入酵母菌中产生了青蒿酸,并通过对代谢网络不断改造和优化,使产量实现了数量级水平的提高^[54]。

2008年2月,Craig Venter 小组合成了生殖支原体的基因组 DNA,这是第一个人工合成的原核生物基因组^[3]。

2008年12月,Becker 等设计并合成了重组的蝙蝠 SARS 样冠状病毒^[19]。

2009年2月,日本东京大学和科学技术振兴机构的 Tomohisa Sawada 等应用纳米技术合成了只有 1 对碱基对的世界最短的双链 RNA 片段和只有 3 对碱基对的双链 DNA 片段^[55]。

2010年1月,美国 *Cell* 杂志和英国 *Nature* 杂志同时为合成生物学创建 10 年发表专题社论,并提出合成生物学将面临的挑战^[29,33,56]。

2010年5月20日,Craig Venter 小组人工合成了蕈状支原体基因组,并在山羊支原体细胞中成功复制、翻译并传代。实现了第一个具有人造基因组的活细胞^[1]。

REFERENCES

- [1] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010. Doi: 10.1126/science.1190719.
- [2] Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, *et al.* Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science*, 2007, **317**(5838): 632–638.
- [3] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, *et al.* Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, **319**(5867): 1215–1220.
- [4] Cook-Deegan RM. The Alta summit, December 1984. *Genomics*, 1989, **5**(3): 661–663.
- [5] Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, *et al.* Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 1986, **321**(6071): 674–679.
- [6] Dulbecco R. A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science*, 1986, **231**(4742): 1055–1056.
- [7] U.S. Department of Energy Office of Science, Office of Biological and Environmental Research. Major events in the U.S. Human Genome Project and related projects. *Md Med*, 2000, **1**(4): 16–19.
- [8] Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science*, 2003, **300**(5617): 286–290.
- [9] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(12): 5463–5467.
- [10] Fleischmann RD, Adams MD, White O, *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995, **269**(5223): 496–512.
- [11] Fraser CM, Gocayne JD, White O, *et al.* The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 1995, **270**(5235): 397–403.
- [12] Bult CJ, White O, Olsen GJ, *et al.* Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 1996, **273**(5278): 1058–1073.
- [13] Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, **409**(6822): 860–921.
- [14] Venter JC, Adams MD, Myers EW, *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, 2001, **291**(5507): 1304–1351.
- [15] [Anon]. The human genome at ten. *Nature*, 2010, **464**(7289): 649–650.
- [16] Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 2002, **297**(5583): 1016–1018.
- [17] Pennisi E. Molecular biology. Venter cooks up a synthetic genome in record time. *Science*, 2003, **302**(5649): 1307.
- [18] Smith HO, Hutchison CA, 3rd, Pfannkoch C, *et al.* Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(26): 15440–15445.
- [19] Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, *et al.* Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(50): 19944–19949.
- [20] Lartigue C, Vashee S, Algire MA, *et al.* Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science*, 2009, **325**(5948): 1693–1696.
- [21] 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, **10**: 941.
- [22] Kung YT, Du YC, Huang WT, *et al.* Total synthesis of crystalline insulin. *Sci Sin*, 1966, **15**(4): 544–561.

- [23] Wang JH. The insulin connection: dorothy hodgkin and the Beijing insulin group. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23**(12): 497–500.
- [24] Ryan MJ, Belagaje R, Brown EL, *et al.* A synthetic tyrosine suppressor tRNA gene with an altered promoter sequence. Its cloning and relative expression *in vivo*. *J Biol Chem*, 1979, **254**(21): 10803–10810.
- [25] 中国科学院上海生物化学研究所, 等. 酵母丙氨酸转移核糖核酸的全合成. *科学通报*, 1982, **27**: 106.
- [26] 王德宝, 郑可沁, 裘慕绶, 等. 酵母丙氨酸转移核糖核酸(酵母丙氨酸 tRNA)人工全合成. *中国科学: B 辑*, 1983, **26**: 385–398.
- [27] Marshall A. The sorcerer of synthetic genomes. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**(12): 1121–1124.
- [28] The Lancet. Reviews and notices of books. *The Lancet*, 1911, **178**(4584): 97–99.
- [29] [Anon]. Ten years of synergy. *Nature*, 2010, **463**(7279): 269–270.
- [30] Elowitz MB, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, **403**(6767): 335–338.
- [31] Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, **403**(6767): 339–342.
- [32] Benner SA, Sismour AM. Synthetic biology. *Nat Rev Genet*, 2005, **6**(7): 533–543.
- [33] Kwok R. Five hard truths for synthetic biology. *Nature*, 2010, **463**(7279): 288–290.
- [34] Kelle A. Ensuring the security of synthetic biology—towards a 5P governance strategy. *Syst Synth Biol*, 2009, **3**(1/4): 85–90.
- [35] Schmidt M. Diffusion of synthetic biology: a challenge to biosafety. *Syst Synth Biol*, 2008, **2**(1/2): 1–6.
- [36] Check E. Synthetic biologists face up to security issues. *Nature*, 2005, **436**(7053): 894–895.
- [37] Wöhler F. Ueber künstliche bildung des harnstoffs. *Annalen der Physik und Chemie*, 1828, **88**(2): 253–256.
- [38] Miller SL. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, 1953, **117**(3046): 528–529.
- [39] Khorana HG. Synthetic nucleic acids and the genetic code. *JAMA*, 1968, **206**(9): 1978–1982.
- [40] Agarwal KL, Buchi H, Caruthers MH, *et al.* Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*, 1970, **227**(5253): 27–34.
- [41] Price PM, Conover JH, Hirschhorn K. Chromosomal localization of human haemoglobin structural genes. *Nature*, 1972, **237**(5354): 340–342.
- [42] Agarwal KL, Besmer P, Buchi H, *et al.* Synthesis of gene for precursor of *E. coli* tyrosine suppressor transfer-RNA. *J Am Chem Soc*, 1973, **95**(8): 29.
- [43] Itakura K, Hirose T, Crea R, *et al.* Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 1977, **198**(4321): 1056–1063.
- [44] Brown EL, Belagaje R, Ryan MJ, *et al.* Chemical synthesis and cloning of a tyrosine tRNA gene. *Methods Enzymol*, 1979, **68**: 109–151.
- [45] Benner SA. Unite efforts and conquer mysteries of artificial genetics. *Science*, 2000, **290**(5496): 1506–1506.
- [46] Wang L, Brock A, Herberich B, *et al.* Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science*, 2001, **292**(5516): 498–500.
- [47] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, *et al.* Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(7): 796–802.
- [48] Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, *et al.* Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**(11): 3240–3244.
- [49] Chang AC, Cohen SN. Genome construction between bacterial species *in vitro*: replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, **71**(4): 1030–1034.
- [50] Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, *et al.* An expanded eukaryotic genetic code. *Science*, 2003, **301**(5635): 964–967.
- [51] Kobasa D, Takada A, Shinya K, *et al.* Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 2004, **431**(7009): 703–707.
- [52] Noireaux V, Libchaber A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(51): 17669–17674.
- [53] Levskaya A, Chevalier AA, Tabor JJ, *et al.* Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature*, 2005, **438**(7067): 441–442.
- [54] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, **440**(7086): 940–943.
- [55] Sawada T, Yoshizawa M, Sato S, *et al.* Minimal nucleotide duplex formation in water through enclathration in self-assembled hosts. *Nat Chem*, 2009, **1**(1): 53–56.
- [56] [Anon]. Synthetic biology select. *Cell*, 2010, **140**(1): 5, 7.