

在这里填上你的标题

第一作者

单位 1 (到系所)

XXXX@XXXX.XXX

摘要: 本文讨论了一个非常重要的问题, 给出了一个相当天才的解答。当然, 如果你这么说, 多半是会被审稿人毙掉的, 所以还是稍微谦虚一点的好。尽量避免使用首次提出, 填补空白这样的用语。

关键词: 关键; 很关键; 非常关键; 关键得不得了

中图分类号: B81

文献标识码: A

1 引言

本世纪初两项创造性的工作, 拨动开关和压缩震荡子, 利用工程化的思想设计人工基因线路并使其实现特定的生理功能。秉承这一思想, 合成生物学在众多学科的交叉中诞生, 逐渐在生命科学领域的研究中受到广泛的关注。近二十年来出现许多重要的突破, 一方面是通过基因组挖掘, 人类利用大量得到定量刻画生物原件设计出了越来越复杂的基因逻辑线路, 相应外界信号并输出预期的结果, 另一方面是利用合成生物学工具, 人类对生命系统工作的原理有了更深层次的认识。在产业方面, 大量具有高价值的复杂产物通过合成基因线路实现了工业化生产, 降低了传统化工合成对环境破坏大的影响。

DNA 测序及合成技术的发展, 进一步降低了人类对基因组读、写的成本; 尽管如此, 我们对基因的解读能力仍处在较低的水平: DNA 序列提供的信息高度复杂, 通过人工组合、设计的基因线路放入到底盘细胞后, 底盘细胞对我们给出的指令的理解往往出乎我们的预期。细胞在执行命令的过程中存在许多细节是我们不清楚或难以定量描述的, 而这些细节也是基因线路的功能实现的重要环节。基因线路的功能实现涉及大量复杂的生命过程, 需要依靠细胞的 DNA 复制系统、转录和翻译系统以及各种代谢产物前体。不同的菌株、不同的生长条件, 都会对基因的表达量产生影响, 而基因线路中不同基因的表达量

决定了线路的输出结果；同时，外源的基因线路的表达对于底盘细胞而言是一种“负担”，外源基因表达将占用有限的 DNA、RNA、蛋白质的合成机器以及各种底物，这种资源上的占用将改变底盘细胞内源的基因表达，进而改变了底盘细胞的生理状态。因此，基因线路和底盘细胞两者相互耦合；然而，长期以来，我们对合成基因的线路设计思路主要集中在基因线路内部的拓扑结构的定量和预测上，忽略了底盘细胞对于基因线路内部原件参数的影响，所以，利用特定条件下的单个模体的定量数据来预测多测模体同时在底盘细胞内的行为会产生偏差。导致合成基因线路设计不可避免得进入“设计—构建—调试”的循环中。不仅如此，许多基因线路，如生物传感器、基因治疗功用的，其工作环境往往非实验室标准环境，底盘细胞生理显然受到环境的影响而发生变化，这使基因线路构建工作增加更多的不确定性。

基因线路设计进入到一个“瓶颈期”后，得益于系统生物学理论以及大量的组学实验方法的建立，近年来，许多工作使得我们对于底盘细胞生理的理解有了更加全局、定量的认识。将底盘细胞的生理状态纳入到对基因线路行为的理解中，许多反直觉的问题迎刃而解；同时，这些理论也被应用到了合成基因线路设计的实践中，给合成基因线路设计带来了新的思路。本文将梳理近年来合成基因线路与底盘细胞相互耦合的理论研究，阐明底盘细胞如何与基因线路相互作用，以及与之相关的定量技术和解耦合的手段。

2 细胞资源有限，存在竞争

细胞通过一系列的生理生化过程从外界环境中摄取维持生长所需的物质，通过同化作用转化为提供复制、转录、翻译和酶促反应等生物过程所需的资源。在不同的环境和生长条件下，细胞必须将其资源分配给不同的任务，以最大限度地提高其适应性¹⁻³。合成基因线路作为外源基因，竞争各种共享资源，如 RNA 聚合酶、核糖体和氨基酸，以及各种生化反应所需的酶和能量^{4, 5}。外源蛋白的表达改变了宿主细胞的生理状态，从而需要重新调配资源来优化利用。底盘细胞-基因线路的相互作用是由外界提供的生长环境、细胞自身生长和基因线路对细胞资源的需求之间的相互协调互作产生的。

2.1 基因线路对底盘细胞的生长影响

当人工基因线路的加入打破了细胞中原有的平衡状态，就可能引发细胞生长压力 (burden)，这种压力可以定义为基因线路对底盘细胞的负载 (load)⁶,

影响细胞的正常生长。另外，原件与底盘细胞的意外互作可能导致毒性。

(1) 人工基因线路在蛋白表达过程中占用了底盘细胞的资源，导致细胞生长受限甚至停止生长。

RNA 聚合酶和核糖体作为转录和翻译过程的重要资源，是影响细胞生理状态的最主要限制因素⁷。在大多数情况下，游离核糖体的水平对基因表达的限制最大，甚至减少细胞中功能性核糖体的数量。研究表明，过度表达非必须蛋白将导致细胞蛋白质合成能力的降低。当非必须蛋白占细胞蛋白总量的约 30% 时，细胞完全停止生长^{1, 8}。

(2) 外源蛋白表达改变的底盘细胞资源调度策略。

研究表明，即使细菌在对数增长的环境下，细胞内的资源分配的策略也可能随时间而改变^{9, 10}。蛋白质的过表达对生长的影响在很大程度上是核糖体重新分配的结果。在外源蛋白质持续表达几代之后，大肠杆菌细胞可以利用 ppGpp 的调控机制，实现对全局性资源的重新分配¹⁰。当 ppGpp 水平变得太高或太低时，细胞生长都会受到抑制。较高的 ppGpp 水平通过直接抑制核糖体合成来抑制细胞生长。相反，由于来自核糖体过量生产的资源竞争，较低的 ppGpp 水平可通过限制代谢蛋白的表达水平来抑制细胞生长；这体现在，在引入外源基因线路的条件下，外源蛋白的持续表达使得核糖体的生产达到顶峰，同时 ppGpp 的积累量也很低，这导致了核糖体的合成被调整以应对额外的蛋白质产生负荷。

(3) 细胞毒性

2.2 基因线路导致底盘细胞生理异质性增强

在细菌细胞中，资源的分配比例可能会随着个体的不同而发生变化，从而使一个细胞在执行的不同功能上达到随机化¹¹。因此，在同基因型的群体中，细胞间微小的差异也会在群体水平上产生表型多样性¹²。外源基因的表达使得这种随机扰动变得更加明显，从而导致底盘细胞的生理异质性增强。

2.3 基因线路内部不同模块之间存在竞争

基因线路中不同的模块之间也会形成竞争关系^{13, 14}，当一个线路中所有的基因都在争夺这些有限的资源时，基因之间就会产生非预期的相互作用，这些相互作用可以极大地改变基因线路的预期行为，导致实验结果与模型预测完全不符。例如，Qian 等人的工作表明，当两个激活模块单独存在时，希尔函数

可以很好的吻合实验结果。但是将两个模块串联形成更复杂的体系后，理论预测的结果甚至和实验结果完全相反¹⁵。

2.4 系统的进化稳定性降低

细胞的生长压力带来的负向筛选作用会减弱人工基因线路的遗传稳定性。研究表明合成线路功能可以给细胞带来很大的适应性劣势 (fitness disadvantage)，并且发生适应性进化以减轻与表达外源蛋白质相关的代谢负荷或毒性。具有较少的基因，较低表达水平和较少重复 DNA 的基因线路表现出较高的进化稳定性¹⁶。高表达的基因线路往往带来更大的筛选压力，在这种进化压力下，细菌通常会选择通过失去功能的突变来逃避非必要表达的负担，从而使复制速度更快的突变细胞超越原始种群的生长。

3 线路的功能与底盘细胞生长耦合

除了底盘细胞有限资源的竞争外，合成基因线路在细胞内还会不可避免地重复至少三个细胞过程：生长、复制和分裂。对于处于指数增长的细菌来说，生长速率是表征细菌生理状态的一项重要指标。细菌生理的重要参数（如基因的拷贝数、RNA、蛋白丰度等）往往可以描述为和细菌生长速率相关的函数¹⁷。在大肠杆菌中，细胞的许多生理参数和生长速率的关系已被定量表征¹⁸。同样，基因元件的相关参数，如启动子启动强度，阻遏蛋白的结合/解离常数，希尔系数以及基因拷贝数等，也不可避免的受到底盘细胞生长状态的影响。此外，细胞中蛋白的降解主要以细胞生长的方式对胞内蛋白进行稀释¹⁹。由此可知，细胞的生长速率对基因表达的影响至关重要。而生长速率对基因线路的反馈作用，可能导致多种多样不可预知的结果。Tan 等人分析了由自激活突变体 T7 RNA 聚合酶组成的基因线路，虽然该自激活过程是非协 (noncooperative)，但该线路可以产生双稳态 (bistability) 基因表达。然而，这一违反直觉的现象可以解释为，基因线路的表达引起了细胞生长速率的减慢，而同时细胞的生长对基因元件的表达存在着反馈调节，从而实现了双稳态现象²⁰。

综上所述，基因表达与细胞生长之间存在着多方面的联系。对这些关系的认识可以提高对基因线路行为认识和预测预测，为合成基因线路的理性设计提供指导。

4 底盘细胞自身的差异以及环境差异

不同生物底盘之间的基因背景差异会导致标准化的基因元件在不同底盘细胞中的输出结果迥然不同²¹，系统性的研究表明同一基因元件在不同的细胞底盘中表达差异甚至能达到一千倍以上²²，这也为合成生物学的标准化设计提出了重大挑战。Moser 等人研究指出转化到不同大肠杆菌菌株中的 AND 逻辑门会有出现不同的表现²³。此外，不同营养成分的培养基以及不同的培养条件也会对基因元件的相应产生重大改变。正是由于底盘细胞或环境的简单改变都可能导致不可预知的影响，甚至导致元件完全失去功能，往往需要在特定的环境中对合成线路的性能进行更广泛地表征。

5 解决方法

6 建立相关模型

针对上述问题的主要解决办法之一就是原核底盘自身对环境响应情况以及底盘与线路之间的互作进行建模预测，并在此基础之上优化线路以及底盘本身以降低上述问题带来的影响。

虽然关于用模型来描述线路与底盘之间的互作是近十几年随着合成生物学而发展出来的一个问题，但是用模型来模拟细胞内全部或主要生理过程的想法却在很早就发展起来了，此类模型称为全细胞模型（whole-cell model）²⁴，而关于外源表达蛋白对宿主本身的影响这个问题也在 1990 年就被 William E. 等人进行了定量的描述¹¹。从进入二十世纪以来，伴随着组学技术、生物定量技术的发展以及运算能力的提高，出现了各种各样的全细胞模型，此处将这些模型大致分为两类来介绍：基于基因组全细胞模型²⁵的和粗粒化的全细胞模型^{1, 26, 27}。其实前者后续处理过程中也涉及到类似后者的分块处理的内容，二者的主要差别在于前者需要通过序列和实验确定大量的针对每个基因的参数，然后再计算得出几大块的相关参数，而后者直接测定几大块成分的相关参数。前者由于参数涉及量庞大，计算需求量较高，近些年未见到开创性的突破，但是便利了仅基于序列进行模拟的应用，推出了 cobra 程序包，但拟合效果比较局限，如果要形成准确的模型还需要大量的实验测定，这限制了这条路的发展；后者近些年基本完善了机制确定，由于其参数确定相对较为简单，且易于理解解释。

6.1 模型相关的机制

全细胞模型的建立大抵上都是基于几种比较一致的机制，可以总结如下：资源分类 (Resource allocation)，资源竞争 (Resource competition)，严谨反应 (Stringent response) 以及反馈调节 (Feedback control)，上述概念不作严格区分，仅是强调机制的不同方面。

资源分类 (Resource allocation)，意在通过将表达模式和功能一致的基因分成一类，藉此降低复杂度并增强可解释性，常见的分类包括 RNA 按功能分为 rRNA, tRNA 和 mRNA，蛋白质按功能分为 ribosomes, metabolic enzymes, core host proteins，以及外源表达的 exogenous proteins，各组分随生长速度变化趋势都不一致，其中 rRNA/mass 的比值以及 ribosomes 在蛋白质中占比随着生长速率增加而增加

资源竞争 (Resource competition) 是包括 RNA 聚合酶对 σ 因子的竞争，基因对 RNAP 的竞争，mRNA 对核糖体的竞争，延伸中的核糖体对氨酰 tRNA 的竞争，蛋白质对蛋白质降解酶的竞争²⁸，RNA 对核糖核酸酶的竞争等，关于这部分的模型已被 R Sabi 和 T Tuller 总结²⁹。

严谨反应 (Stringent response) 是指生物在营养不充分情况下用来降低生长速度的机制，在一系列有关信号分子中 ppGpp 是比较著名的一个，它在多个层面同 RNAP、核糖体结合，全方面的抑制细胞代谢活性。

反馈调节 (Feedback control) 是强调细胞中在资源分类后由于各种资源类别内部和之间的竞争效应和严谨反应，在丰富了互作网络后，进而形成的各种拓扑结构对整体动力学的影响。

6.2 基于基因组的全细胞模型

基于基因组的全细胞模型主要是随着组学技术的兴起发展起来的，自 2000 年以来组学方面经历了构建全基因组网络结构、整合组学数据阶段，到拥有一定的预测能力。2012 年 Karr J R 等人在 Cell 上发表了该领域的经典工作，介绍了基于组学数据对 *Mycoplasma genitalium* 进行全细胞模型建立的相关细节，对其细胞周期中的每个注释过的基因产物及反应都建立了描述性的方程，并可以对基因组各基因与转录因子之间的互作等诸多细胞行为做出预测，在这基础上通过对单基因扰动的模拟发现了已注释基因的新功能。

6.3 粗粒化模型

粗粒化的模型对细胞的描述也大致遵从上面描述的机制，早期细胞生理学家关注的问题是如何预测特定环境下的细胞生长速度，上世纪末开始一批人意识到单纯的从能量角度是无法解释对应实验结果的，并注意到前体代谢物对生长的关键作用以及蛋白质合成和底物之间的调节效应，相关内容总结于30。合成生物学发展起来以后为细胞生理领域引入了新的可观测现象——蛋白质动力学表现，并引入了更精细的调控要求。同时关于细胞的粗粒化总结也更加准确，Hwa T. 及其同事于 2010 年基于实验现象将蛋白质组确定为核糖体相关部分、代谢部分和管家部分，实验中观察得到的现象被应用于各种模型验证1。2015 年 Weiße 等人系统性地从能量角度整合并精简了相关因素，同时对可能的线路与宿主之间的作用进行了模拟并做出了较为准确的预测26。2017 年 Liao 等人引入 ppGpp 作为全局调控因子，进一步对 nutrition shift 中的实验现象进行了解释，并且引入了更多的竞争机制成功解释了对应的实验现象27。

6.4 底盘与线路之间的互作

底盘与线路之间的互作大体上同底盘内部的资源竞争一致，早期关于外源表达基因对宿主生理的定量影响见于 1990 年 Dhinakar S Kompala 的工作31。竞争方面的效应同经济领域和电子系统中较为类似，相关规律也被应用于描述该行为6, 14。具体的不同线路对竞争效应的响应也在各种文献中陆续被描述32, 33。在上个模块中的粗粒化模型相关文献中也能见到集中讨论底盘线路互作的版块，其中 Liao 的工作强调了对线路相关蛋白对宿主在毒性和代谢方面的特异性影响需要刻画27。

7 合成基因线路正交化

正交化是希望基因线路在实现其内部的逻辑调控的同时，尽可能减少其内部原件与原件之间，以及原件与底盘细胞自身系统的不必要的交互。基因线路会不可避免地使用底盘细胞的各种资源，在特定情况下也需要建立与底盘细胞系统的相互调节接口，比如在进行天然产物的生产中，将对底盘细胞原有的代谢网络进行连接；当前，正文化的工作主要集中在对基因原件的正交设计中，通过对基因原件的定量测试和定向进化，使其发挥出更好的功能同时，减少对底盘细胞的不必要干扰；另一方面，正文化基因线路，减少了与底盘细胞的过

多交互, 则在进行模拟预测的时可以减少参数, 提高系统的可预测性。通过对基因库中挖掘, 正交化的 DNA 复制、转录、翻译系统也不断涌现出来, 正交中心法则系统这一概念也被提出。正交中心法则系统希望中心法则中涉及的生物合成过程使用一套正交的系统完成, 可以类比为计算机科学中虚拟机的概念³⁴。

完整的 DNA 正交复制系统应当可以在 DNA—DNA 聚合酶层面实现正交, 即一种 DNA 聚合酶专门负责复制特定的 DNA 序列; 例如, 在酿酒酵母中, 源自于 *Kluyveromyces lactis* 的两个细胞质质粒能够利用相互独立的 DNA 聚合酶进行复制, 通过基因工程改造, 可以独立控制两个质粒的复制突变率³⁵。正交转录机器则早已广泛在合成生物领域使用, 噬菌体 RNA 聚合酶便是使用最多的原件, 这类 RNA 聚合酶识别特定的启动子序列进行转录, 大多为单体酶, 且具有很强的转录活性。同时他们也容易被改造成为蛋白相互作用层次的逻辑门, 例如对其结构域进行分割, 融合其他类型的蛋白或结构域可以丰富其功能。例如, 将 T7 RNA 聚合酶分割为两个部分, 分别融合感光同源二聚蛋白结构域 (VVD), 可以使其在蓝光下形成二聚体从而激活转录^{36, 37}。类似的, 将 RNA 聚合酶与 DNA 识别结构域与锌指蛋白 (ZFNs), 转录样激活因子 (TALENs) 或 CRISPR Cas 蛋白等具有可设计能力的核酸酶进行组合, 可以扩展其使用的范畴, 例如拓展其转录动力学范围³⁸。另一类正交转录系统则基于 σ 因子, 利用不同来源的 ECF σ 因子, 通过共享 RNA 聚合酶的核心酶库, 不同家族的 ECF σ 因子对启动子的序列的不同亲和性, 可以设计出正交的 ECF σ 因子组合, 实现在转录层面的绝缘³⁹。蛋白的翻译涉及到大量复杂的生物过程, 通过理性化和定向进化等手段, 近年来也取得大量的进展。改造氨酰 tRNA 合成酶可以将非天然氨基酸引入到蛋白的序列中, 有希望给蛋白带来更多样的生理功能; 全合成基因组的手段, 成功将 64 种密码子压缩到了 61 种, 为编码非天然氨基酸打下了基础⁴⁰。通过改变核糖体 16S rRNA 的序列, 可以得到正交核糖体, 识别非典型的 RBS 序列, 从而绝缘合成基因线路和底盘细胞的基因表达^{41, 42}。

转录因子是合成基因线路设计中主要承担逻辑运算的原件, 这类原件识别特定的序列激活或抑制下游基因的转录, 未经正交化的转录因子存在相互之间交叉识别位点的风险, 另外对底盘细胞管家基因相关序列的结合会影响细胞生长, 产生毒性。目前转录因子除了典型的阻遏蛋白和激活蛋白, 还有具有识别序列功能的蛋白, 如 dCas9、TALENs 等。但是这类蛋白往往具有细胞毒性; 例如, 高表达 dCas9 将严重影响细胞生理, 导致细胞分裂速度降低, 形态发生变

化,通过组学实验发现了高表达水平下 dCas9 非特异性结合到基因组上影响转录水平⁴³,另外也有实验表明 gRNA 只含有 9 碱基与目标位点匹配的情况下,也能有效结合到基因组上引起转录下调⁴⁴,这对特异的 gRNA 的设计带来困难。通过突变 dCas9 的 PAM 识别区并融合阻遏蛋白 PhlF 的 dCas9_Phlf 可以增强其特异性减少毒性,使细胞能耐受更高的表达量。另外,通过定向进化等手段对阻遏蛋白进行优化,也有助于降低细胞毒性⁴⁵。

对正交系统进行合理的设计,可以部分解决蛋白表达过程中资源竞争的问题。在外源基因表达的过程中,两个独立的基因线路因为共享底盘细胞的各种资源库,因此两个基因线路的表达相互耦合,可以用“等成本线”来描述。利用正交核糖体系统,通过表达正交 16s rRNA 将底盘细胞的核糖体库分为两组,其中一组倾向于翻译带有对应的正交 RBS 的基因线路,利用这套系统减轻了由于基因表达过程种资源分配带来的耦合问题⁴⁶。

8 模块化控制系统

合成生物学的一大愿景是实现基因原件的即插即用,即通过对基因原件的排列组合实现复杂的调控,但事实上,简单地将基因线路组合后还需要大量的微调才能实现最终目的,这种微调的工作随着基因线路的规模变大而越发难以实现。除了在原件设计过程中的模块化,更高层次的模块化进来得到了广泛的关注:将功能线路,例如逻辑门等,进行模块化,使得每一个实现特定功能的线路的输入输出在插入到基因线路中时不发生变化。进行功能模块化首要要解决回溯效力(retroactivity),基因线路中各个功能模块之间的相互作用主要由转录因子来实现,而转录因子与下游模块的作用,例如结合到基因位点将导致游离转录因子浓度,进而扰动上游模块;同样的,对于底盘细胞而言,基因线路对转录翻译资源的消耗,将改变细胞生长速度以及各种资源库的总量,进而又影响了基因线中的各种动力学参数,如转录翻译速度和稀释速度。因此,功能模块化的目标是希望其输入输出不受外部参数影响而变化。

负反馈调节可以使基因线路的稳态输出水平仅与自生原件的动力学性质决定,而不受基因表达生成和稀释速率影响。当前大量基于反馈控制的解决方案已经被应用到基因线路的设计上,可以归结为局部水平和全局水平两类。

局部水平的反馈策略主要着眼于功能模块输出本身的稳定性,希望利用负反馈系统来隔离模块与模块之间,以及模块与底盘细胞之间的相互影响。例如,使用转录后调控原件 sRNA 形成负反馈环,使每一模块的稳态表达水平都

得以固定,使得它们对来自资源竞争产生的扰动具有抵抗的能力⁴⁷。Aoki 等人则采用了对偶积分反馈的策略,在保证模块输出抗扰动能力同时,还模块稳态输出水平是动态可调的⁴⁸。

基于全局的资源调控反馈策略能够根据基因线路表达带来的负担对所需的资源进行调控。在正交核糖体基因表达系统中加入反馈控制模块,能够实现对正交核糖体与内源核糖体比例的动态分配,使正交核糖体的比例按需分配给基因线路,减轻基因线路内部的资源竞争带来的耦合⁴⁶。

另一种反馈策略则由宿主生理状态决定,根据代谢压力的大小来决定外源基因的表达。通过实验筛选出外源基因高表达时转录水平上调的启动子,利用这类启动子激活下游基于 dCas9 的转录抑制系统,从而确保外源基因线路对细胞的压力维持在一个较低的水平⁴⁹。

除了负反馈环这一策略外,另一种基于转录调控的模块化手段则采用了非协调前馈环 (incoherent feedforward loop, iFFL), Segall-Shapiro 等人通过对 iFFL 模体的分析,指出当反馈环中的阻遏蛋白的协同系数为 1 时,稳态下模体的输出将满足一个常数而不依赖基因的拷贝数、细胞生长速度,通过这一简单的策略,可以使基因在不同拷贝数下实现稳定表达⁵⁰。

9 进化稳定性

基因线路给底盘细胞带来压力同时导致底盘细胞生长速度往往低于野生型菌株,而突变导致的含有失效的基因线路的菌株往往具有更好的适应性,这样一来,在连续培养的过程中,带有期望功能的合成菌株会逐渐失去优势。因此提高基因线路在底盘细胞中的进化稳定性也是重要的话题。Sleight 等人¹⁶评估了带有不同的调控原件的三种荧光蛋白在大肠杆菌中的进化稳定性,发现表达量低和带有更少的重复序列的基因线路具有更好的进化稳定性。重复序列容易导致基因重组进而导致序列丢失,有必要建立更大的优质原件库,减少原件在同一基因线路中的重复使用,同时在设计的环节中加入同源序列检查的过程,避免原件组合的过程中产生意外的同源序列。降低表达量除了可以用上文提到的反馈控制系统来稳定基因的表达水平,也可以将基因线路的目的输出与关键基因的表达偶联起来^{51, 52},例如在带有合成特定产物的基因线路的菌株中再添加一个能够相应产物的感应插件,该感应插件能够调控一些条件关键基因,当合成线路失效后,感应插件停止表达条件关键基因,进而淘汰突变的菌株,从本质上讲,这也是一种与生理状态偶联的正反馈回路。

10 总结与展望

过去 20 年来, 合成生物学领域涌现出了大量创造性的工作, 证明了利用合成生物学理论方法改造生命为人类所用的可行性。未来, 合成基因线路需要能够适应更多的遗传背景迥异的底盘细胞, 以及更加复杂多变的使用环境。然而, 由于我们对底盘细胞的系统性认识的缺乏导致更为复杂的人工生命系统的开发工作效率低下。本文总结了当前关于细胞生理定量, 底盘细胞与底盘细胞相互耦合的机制, 以及如何避免因耦合引起的基因线路失效等方面的研究进展。我们认为在未来应当注重: 1. 更加系统、量化的底盘细胞生理研究, 理清底盘细胞在各种条件下, 如在逆境、非稳态, 的资源调控机制, 扩大研究的底盘细胞的种类; 2. 挖掘、定量、优化更多的正交基因调控原件, 阐明不同遗传背景的底盘细胞基因原件的性能; 3. 开发更加精准、高通量的定量手段, 利用多层次的组学技术, 为定量刻画底盘细胞—基因线路相互作用机制提供更加可靠、全面的数据; 4. 建立更加精准的模型预测框架, 将底盘细胞与线路的模型描述整合在一起, 增强基因线路行为的可预测性; 5. 建立规避“非期望”的底盘细胞与基因线路相互作用的解决方案, 如利用反馈控制机制设计更加模块化的基因线路。

参考文献

- [1] M. Scott, C. W. Gunderson, E. M. Mateescu, Z. Zhang and T. Hwa, 2010, “Interdependence of cell growth and gene expression: Origins and consequences”, *Science* (80-.). **330(6007)**: 1099–1102.
- [2] C. You, H. Okano, S. Hui, Z. Zhang, M. Kim, C. W. Gunderson, Y. P. Wang, P. Lenz, D. Yan and T. Hwa, 2013, “Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling”, *Nature*, **500(7462)**: 301–306.
- [3] S. Hui, J. M. Silverman, S. S. Chen, D. W. Erickson, M. Basan, J. Wang, T. Hwa and J. R. Williamson, 2015, “Quantitative proteomic analysis reveals a simple strategy of global resource allocation in bacteria”, *Mol. Syst. Biol.* **11(2)**: 784.
- [4] O. Borkowski, F. Ceroni, G. B. Stan and T. Ellis, 2016, “Overloaded and stressed: whole-cell considerations for bacterial synthetic biology”, *Curr. Opin. Microbiol.* **33**: 123–130.
- [5] B. D. Towbin, Y. Korem, A. Bren, S. Doron, R. Sorek and U. Alon, 2017, “Optimality and sub-optimality in a bacterial growth law”, *Nat. Commun.* **8**: 1–8.

- [6] M. Carbonell-Ballester, E. Garcia-Ramallo, R. Montañez, C. Rodriguez-Caso and J. Macía, 2016, “Dealing with the genetic load in bacterial synthetic biology circuits: Convergences with the Ohm’s law”, *Nucleic Acids Res.* **44(1)**: 496–507.
- [7] Q. Liu, J. Schumacher, X. Wan, C. Lou and B. Wang, 2018, “Orthogonality and Burdens of Heterologous and Gate Gene Circuits in *E. coli*”, *ACS Synth. Biol.* **7(2)**: 553–564.
- [8] J. Vind, M. A. Sørensen, M. D. Rasmussen and S. Pedersen, 1993, “Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes: Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels”, *J. Mol. Biol.* **231(3)**: 678–688.
- [9] I. Shachrai, A. Zaslaver, U. Alon and E. Dekel, 2010, “Cost of Unneeded Proteins in *E. coli* Is Reduced after Several Generations in Exponential Growth”, *Mol. Cell*, **38(5)**: 758–767.
- [10] M. Zhu and X. Dai, 2019, “Growth suppression by altered (p)ppGpp levels results from non-optimal resource allocation in *Escherichia coli*”, *Nucleic Acids Res.* **47(9)**: 4684–4693.
- [11] P. Thomas, G. Terradot, V. Danos and A. Y. Weiße, 2018, “Sources, propagation and consequences of stochasticity in cellular growth”, *Nat. Commun.* **9(1)**: 1–11.
- [12] J. Kim, A. Darlington, M. Salvador, J. Utrilla and J. I. Jiménez, 2020, “Trade-offs between gene expression, growth and phenotypic diversity in microbial populations”, *Curr. Opin. Biotechnol.* **62**: 29–37.
- [13] N. A. Cookson, W. H. Mather, T. Danino, O. Mondragón-Palomino, R. J. Williams, L. S. Tsimring and J. Hasty, 2011, “Queueing up for enzymatic processing: Correlated signaling through coupled degradation”, *Mol. Syst. Biol.* **7(1)**:
- [14] A. Gyorgy, J. I. Jiménez, J. Yazbek, H. H. Huang, H. Chung, R. Weiss and D. Del Vecchio, 2015, “Isocost Lines Describe the Cellular Economy of Genetic Circuits”, *Biophys. J.* **109(3)**: 639–646.
- [15] Y. Qian, H. H. Huang, J. I. Jiménez and D. Del Vecchio, 2017, “Resource Competition Shapes the Response of Genetic Circuits”, *ACS Synth. Biol.* **6(7)**: 1263–1272.
- [16] S. C. Sleight and H. M. Sauro, 2013, “Visualization of evolutionary stability dynamics and competitive fitness of *Escherichia coli* engineered with randomized multigene circuits”, *ACS Synth. Biol.* **2(9)**: 519–528.
- [17] S. Klumpp, Z. Zhang and T. Hwa, 2009, “Growth Rate-Dependent Global Effects on Gene Expression in Bacteria”, *Cell*, **139(7)**: 1366–1375.

- [18] A. D. Mcguire, J. S. Clein, J. M. Melillo, D. W. Kicklighter, R. A. Meier, C. J. Vorosmarty and M. C. Serreze, 2000, “Modelling carbon responses of tundra ecosystems to historical and projected climate: Sensitivity of pan-Arctic carbon storage to temporal and spatial variation in climate”, *Glob. Chang. Biol.* **6(SUPPLEMENT 1)**: 141–159.
- [19] M. Hintsche and S. Klumpp, 2013, “Dilution and the theoretical description of growth-rate dependent gene expression”, *J. Biol. Eng.* **7(1)**: 22.
- [20] C. Tan, P. Marguet and L. You, 2009, “Emergent bistability by a growth-modulating positive feedback circuit”, *Nat. Chem. Biol.* **5(11)**: 842–848.
- [21] S. Cardinale, M. P. Joachimiak and A. P. Arkin, 2013, “Effects of genetic variation on the e. coli host-circuit interface”, *Cell Rep.* **4(2)**: 231–237.
- [22] C. Vilanova, K. Tanner, P. Dorado-Morales, P. Villaescusa, D. Chugani, A. Frías, E. Segredo, X. Molero, M. Fritschi, L. Morales, D. Ramón, C. Peña, J. Peretó and M. Porcar, 2015, “Standards not that standard”, *J. Biol. Eng.* **9(1)**: 17.
- [23] F. Moser, N. J. Broers, S. Hartmans, A. Tamsir, R. Kerkman, J. A. Roubos, R. Bovenberg and C. A. Voigt, 2012, “Genetic circuit performance under conditions relevant for industrial bioreactors”, *ACS Synth. Biol.* **1(11)**: 555–564.
- [24] J. Carrera and M. W. Covert, 2015, “Why Build Whole-Cell Models?”, *Trends Cell Biol.* **25(12)**: 719–722.
- [25] J. R. Karr, J. C. Sanghvi, D. N. MacKlin, M. V. Gutschow, J. M. Jacobs, B. Bolival, N. Assad-Garcia, J. I. Glass and M. W. Covert, 2012, “A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype”, *Cell*, **150(2)**: 389–401.
- [26] A. Y. Weiße, D. A. Oyarzún, V. Danos and P. S. Swain, 2015, “Mechanistic links between cellular trade-offs, gene expression, and growth”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112(9)**: E1038–E1047.
- [27] C. Liao, A. E. Blanchard and T. Lu, 2017, “An integrative circuit – host modelling framework for predicting synthetic gene network behaviours”, *Nat. Microbiol.* **2(12)**: 1658–1666.
- [28] N. C. Butzin and W. H. Mather, 2018, “Crosstalk between Diverse Synthetic Protein Degradation Tags in Escherichia coli”, *ACS Synth. Biol.* **7(1)**: 54–62.
- [29] R. Sabi and T. Tuller, 2019, “Modelling and measuring intracellular competition for finite resources during gene expression”, *J. R. Soc. Interface*, **16(154)**: 20180887.
- [30] A. G. Marr, 1991, “Growth rate of Escherichia coli”, *Microbiol. Rev.* **55(2)**: 316–333.
- [31] W. E. Bentley, N. Mirjalili, D. C. Andersen, R. H. Davis and D. S. Kompala, 1990, “Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria”, *Biotechnol. Bioeng.* **35(7)**: 668–681.

- [32] T. E. Gorochowski, I. Avcilar-Kucukgoze, R. A. Bovenberg, J. A. Roubos and Z. Ignatova, 2016, “A Minimal Model of Ribosome Allocation Dynamics Captures Trade-offs in Expression between Endogenous and Synthetic Genes”, *ACS Synth. Biol.* **5(7)**: 710–720.
- [33] E. M. Nikolados, A. Y. Weiße, F. Ceroni and D. A. Oyarzún, 2019, “Growth Defects and Loss-of-Function in Synthetic Gene Circuits”, *ACS Synth. Biol.* **8(6)**: 1231–1240.
- [34] C. C. Liu, M. C. Jewett, J. W. Chin and C. A. Voigt, 2018, “Toward an orthogonal central dogma”, *Nat. Chem. Biol.* **14(2)**: 103–106.
- [35] A. Ravikumar, A. Arrieta and C. C. Liu, 2014, “An orthogonal DNA replication system in yeast”, *Nat. Chem. Biol.* **10(3)**: 175–177.
- [36] T. Han, Q. Chen and H. Liu, 2017, “Engineered Photoactivatable Genetic Switches Based on the Bacterium Phage T7 RNA Polymerase”, *ACS Synth. Biol.* **6(2)**: 357–366.
- [37] A. Baumschlager, S. K. Aoki and M. Khammash, 2017, “Dynamic Blue Light-Inducible T7 RNA Polymerases (Opto-T7RNAPs) for Precise Spatiotemporal Gene Expression Control”, *ACS Synth. Biol.* **6(11)**: 2157–2167.
- [38] S. R. McCutcheon, K. L. Chiu, D. D. Lewis and C. Tan, 2018, “CRISPR-Cas Expands Dynamic Range of Gene Expression From T7RNAP Promoters”, *Biotechnol. J.* **13(5)**:
- [39] V. A. Rhodius, T. H. Segall-Shapiro, B. D. Sharon, A. Ghodasara, E. Orlova, H. Tabakh, D. H. Burkhardt, K. Clancy, T. C. Peterson, C. A. Gross and C. A. Voigt, 2013, “Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters”, *Mol. Syst. Biol.* **9(1)**: 702.
- [40] J. Fredens, K. Wang, D. de la Torre, L. F. Funke, W. E. Robertson, Y. Christova, T. Chia, W. H. Schmied, D. L. Dunkelmann, V. Beránek, C. Uttamapinant, A. G. Llamazares, T. S. Elliott and J. W. Chin, 2019, “Total synthesis of Escherichia coli with a recoded genome”, *Nature*:
- [41] O. Rackham and J. W. Chin, 2005, “A network of orthogonal ribosome • mrna pairs”, *Nat. Chem. Biol.* **1(3)**: 159–166.
- [42] W. An and J. W. Chin, 2009, “Synthesis of orthogonal transcriptiontranslation networks”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106(21)**: 8477–8482.
- [43] S. Cho, D. Choe, E. Lee, S. C. Kim, B. Palsson and B. K. Cho, 2018, “High-Level dCas9 Expression Induces Abnormal Cell Morphology in Escherichia coli”, *ACS Synth. Biol.* **7(4)**: 1085–1094.
- [44] L. Cui, A. Vigouroux, F. Rousset, H. Varet, V. Khanna and D. Bikard, 2018, “A CRISPRi screen in E. coli reveals sequence-specific toxicity of dCas9”, *Nat. Commun.* **9(1)**: 1–10.

- [45] A. J. Meyer, T. H. Segall-Shapiro, E. Glassey, J. Zhang and C. A. Voigt, 2019, “Escherichia coli “Marionette” strains with 12 highly optimized small-molecule sensors”, *Nat. Chem. Biol.* **15(2)**: 196–204.
- [46] A. P. Darlington, J. Kim, J. I. Jiménez and D. G. Bates, 2018, “Dynamic allocation of orthogonal ribosomes facilitates uncoupling of co-expressed genes”, *Nat. Commun.* **9(1)**: 695.
- [47] H. H. Huang, Y. Qian and D. Del Vecchio, 2018, “A quasi-integral controller for adaptation of genetic modules to variable ribosome demand”, *Nat. Commun.* **9(1)**: 5415.
- [48] S. K. Aoki, G. Lillacci, A. Gupta, A. Baumschlager, D. Schweingruber and M. Khammash, 2019, “A universal biomolecular integral feedback controller for robust perfect adaptation”, *Nature*, **570(7762)**: 533–537.
- [49] F. Ceroni, A. Boo, S. Furini, T. E. Gorochoowski, O. Borkowski, Y. N. Ladak, A. R. Awan, C. Gilbert, G. B. Stan and T. Ellis, 2018, “Burden-driven feedback control of gene expression”, *Nat. Methods*, **15(5)**: 387–393.
- [50] T. H. Segall-Shapiro, E. D. Sontag and C. A. Voigt, 2018, “Engineered promoters enable constant gene expression at any copy number in bacteria”, *Nat. Biotechnol.* **36(4)**: 352–358.
- [51] P. Rugbjerg, K. Sarup-Lytzen, M. Nagy and M. O. A. Sommer, 2018, “Synthetic addiction extends the productive life time of engineered Escherichia coli populations”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115(10)**: 2347–2352.
- [52] Y. Xiao, C. H. Bowen, D. Liu and F. Zhang, 2016, “Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis”, *Nat. Chem. Biol.* **12(5)**: 339–344.

(责任编辑：某某某)

Title

First Author

affiliation 1

another affiliation

xxxx@xxxx.xxx

Abstract

Abstract