

# 植物合成生物学

ppt制作：陈谦子

讲解：陈谦子

# 摘要

- Plant synthetic biology is an emerging field that combines engineering principles with plant biology toward the design and production of new devices. This emerging field should play an important role in future agriculture for traditional crop improvement, but also in enabling novel bioproduction in plants.
- 植物合成生物学是一个结合了工程学原理与植物生物学以取得设计和产品方面新计划的新兴领域。这个新兴领域可以在未来农业中改进传统作物的方向上起到重要作用，也使得培育新奇的植物生物产品的实现成为可能。

- In this review we discuss the design cycles of synthetic biology as well as key engineering principles, genetic parts, and computational tools that can be utilized in plant synthetic biology. Some pioneering examples are offered as a demonstration of how synthetic biology can be used to modify plants for specific purposes. These include synthetic sensors, synthetic metabolic pathways, and synthetic genomes. We also speculate about the future of synthetic biology of plants.
- 在这篇综述中我们讨论了植物合成生物学的设计流程，同时也包括了主要的工程学原理，遗传学部分，以及可以在植物合成生物学中应用的计算机工具。本文也提供了一些首创性的例子以论证合成生物学是如何为特定目的而修饰植物的。这些例子包括了合成感应器，合成新陈代谢途径，以及合成基因组。我们还预测了植物合成生物学的未来。

# Guide

- Introduction
- 1.Simple beginnings: synthetic biology in bacteria and beyond
- 2.Plant synthetic biology: an emerging discipline
- 3.Design cycle of synthetic biology
- 4.Fundamental engineering principles
- 5.Selecting components for plant synthetic devices
- 6.Computational tools for design and modeling
- 7.Pioneering examples of plant synthetic biology
- 8.Concluding remarks and future perspectives

# 简单的开始：细菌及其之上的合成生物学

- 合成生物学最早是从细菌层面开始发展的，现在已经进展到包括植物的真核生物上。随着第一个合成通路-基因拨动开关和“压缩震荡子”的出现-第一波合成生物学的浪潮随着人工基因通路以及用以概念证明的小型模块的成功论证而开始。
- 合成生物学项目也已经完成重建噬菌体FX174，重构噬菌体T7，构建一个包含1.08 Mb的支原体基因组的人造细菌细胞的进程。
- 微生物合成生物学的进展已经转化为可以解决生物医学和工业问题的成果，诸如环境可控的癌细胞侵蚀细菌和作为抗生素佐剂的防御增强噬菌体。
- 合成生物学方法是易操作且有用的，特别是当有充足的研究资金和系统能充分理解时。然而，植物合成生物学的研究仍处于起步阶段。

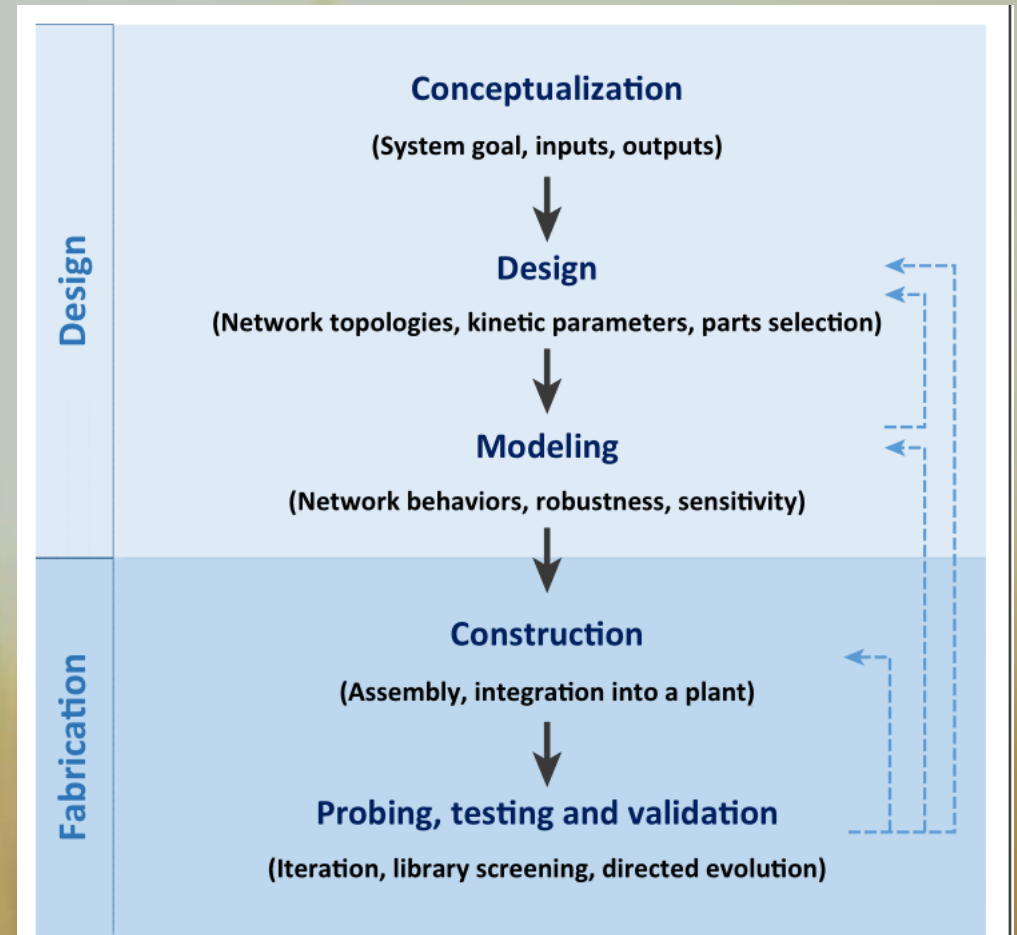
# 植物合成生物学：新兴学科

- 合成生物学旨在运用工程学原理于自然系统的设计和改造，实现使人造生物装置和系统表现出可预知的行为。其制程过程可类比于自动机械。可以调整较旧的型号以获得更高效率（从上到下）可以从头开始构建新的模块（从下到上）。
- 旨在构建一个最小尺寸的系统，通过降低其复杂性来减少部件数量。
- 合成生物学的目标是为达成特定目的而重新设计系统，通过重新构建的方式来更好地理解生物学。
- 系统生物学提供了合成生物学设计构建的知识基础，合成生物学通过重建增强了系统生物学中对系统层次上的理解。



# 合成生物学的设计流程

- 合成生物学理想化的设计流程包括五个阶段：概念化，设计，建模，构建，最后，检测，测试和验证。
- 概念化：系统目标，输入，输出
- 设计：网络拓扑，动力学参数，部件选择
- 建模：网络行为，鲁棒性，敏感度
- 构建：装配，整合进一个植物
- 检测，测试和验证：迭代，数据库筛选，定向进化



# 合成生物学的设计流程

- 合理制定目标，使它们可以明确地制作和测试。
- 计算机辅助设计（CAD）用于帮助确定和优化网络层次结构，动力学参数和零件选择。
- 多次迭代可能产生一系列改进的近似的解决方案以最终获得所需的功能。
- 实现植物的合成生物学设计流程的工具包括工程学原理设计，零件选择的组件和用于植物设计和建模的计算机工具。



# 基本工程学原理

- 降低固有的植物高度复杂性和冗余，植物合成生物学使用最重要的，最基础的工程学原理：去耦，抽象化和标准化。
- 去耦可以简化复杂的问题，成为许多便于解决的小问题。
- 抽象化使得工程师可以解构一个自动机械，例如，转化为传动装置，电子装置和内部装置。
- 标准化依赖于模块化和零件的正交性，并允许零件组装形成一个复杂的系统。
- 通过解耦，抽象化和标准化的技术过程可以简化和分解问题，减少设计流程的耗费。

# 选择植物合成装置的零件

- 生物系统可以简化为零件和模块来进行重建，需要将原料从自然环境中提取并精炼出来，使其独立并具有正交性，这些部分包括顺式调节元件，启动子，转录起始蛋白质结构域，蛋白质编码开放阅读区（ORF）和终止。
- 合成零件可以组合模块化获得不同的分层功能，如合成基因，途径，基因组和/或聚集生物装置和网络。
- 知识产权和专利问题导致很多植物组件无法进入公共领域。

# 用于设计和建模的计算机工具

- CAD工具是合成生物学中最重要的工具。使用CAD工具合成生物学家可以通过调整设计参数和测试构建前的可能设计方案，提高合成装置的功能和性能。

这些工具可以分为三类：组件设计和合成，拓扑和网络设计，行为预测与模拟。

虽然这些工具中有许多已经被设计出来并针对原核生物进行了优化，有些是可用于植物合成生物学的可适应性地为植物合成生物学提供正交实验的。但更多用以解决植物特定的问题专用于植物合成生物学的新型工具还正在开发中。

# 表1：现有的可用于植物合成生物学的计算机工具

Table 1. Currently available computational tools for plant synthetic biology			
Software	Description	Adaptability to plants	Refs
<i>Component synthesis and design</i>			
GeneDesign	Web server with algorithms for codon optimization and codon bias graphing so that insertion of restriction sites and design of building blocks are supported.	Ready for plants	[50]
Gene Designer2.0	Software for gene, operon, and vector design, codon optimization, restriction site modification, ORF recoding and primer design.	Ready for plants	[51]
<i>Topology and network design</i>			
GenoCAD	A framework including a formal semantic model that represents the dynamics of multiple part sequences using attribute grammar. It formalizes the context dependency of part functions and translates part sequences to a model to predict their behaviors and to users through interactive 'grammar checking' of the design drafts.	Mainly for <i>Escherichia coli</i>	[52]
OptCircuit	An optimization-based framework that automatically identifies components from a list and their connectivity for circuit redesign. It compiles comprehensive kinetic descriptions of promoter-protein interactions using deterministic ordinary differential equations and stochastic simulations.	Can be adapted	[53]
SynBioSS	Software suite for network design and simulation by calculating probability distributions of dynamic biological phenotypes. It contains three components: Designer, WIKI, and Simulator. Designer can transform part sequences into models for simulation in Simulator.	Can be adapted	[54,55]
CellDesigner	Software for graphical drawing of regulatory and biochemical networks.	Can be adapted	[56,57]
e-Cell	A modeling and simulation environment for cellular behavior prediction by building integrative models of the cell based on gene regulation, metabolism, and signaling and running <i>in silico</i> experiments.	Can be adapted	[58,59]
<i>Simulation and behavior prediction</i>			
COPASI	A stand-alone biochemical network simulator that allows easy switches between different simulation approaches.	Can be adapted	[60,61]
CompuCell3D	A multicell, multiscale model for simulation of highly conserved vertebrate somatogenesis by combining specialized hypotheses for specific subcomponent mechanisms into a unified multiscale model.	Can be adapted	[62,63]
CellModeller	A generic tool for the analysis and modeling of multicellular plant morphogenesis by analyzing hierarchical physical and biochemical morphogenetic mechanisms.	Plant specific	[64–66]

# 植物合成生物学中的先驱实例

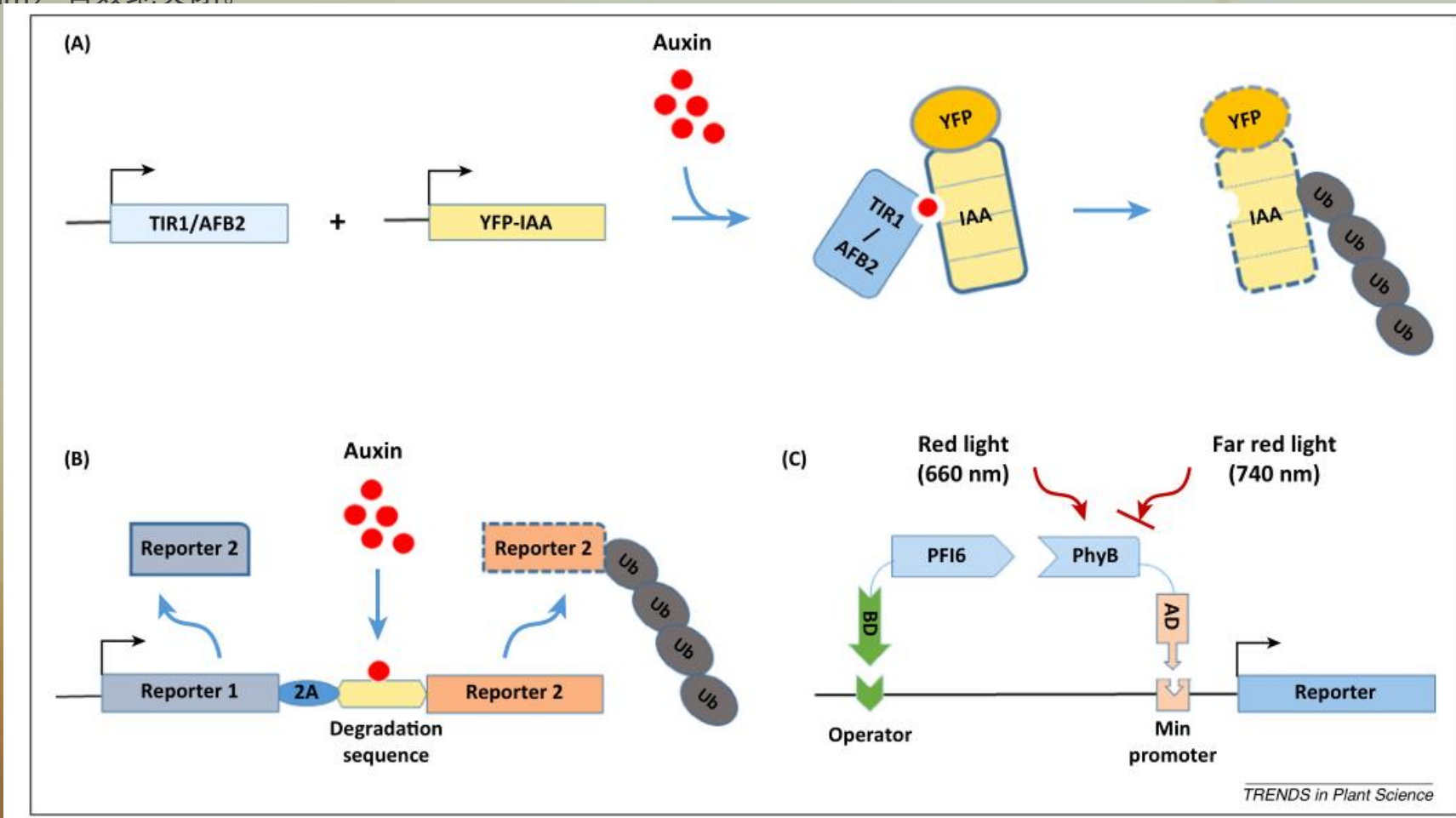
- 迄今为止，只有少数的植物合成生物学的例子，如合成传感器和合成代谢途径。在植物中合成基因组已经发展出相关流程，但我们仍然在研究的早期阶段。

# 综合传感器

- 综合传感器可理解为在生物工程中的转录-翻译或翻译后的控制形式，并且它允许细胞识别和报告存在的内部或外部刺激。翻译后的控制传感器的一个很好的例子是在酵母中监测生长素诱导的吲哚乙酸（IAA）的合成通路的构建。生长素激活基因的表达是通过与生长素受体F-box蛋白TIR1 / AFBs互作导致的IAA翻转实现的。植物生长素的外部应用和成对杂交的酵母表达都是通过TIR1/AFB或者YFP-IAA许可植物生长素去把它的感受器和IAA亚基II捆绑在一起。这导致了泛素化和IAA的降解，同时使它可以被YFP荧光监测到(Figure 2A)。该设备允许外部生长素应用精确的控制（输入）对IAA耦合YFP荧光动态测量（输出），这可以用于研究IAA和TIR1 /AFB对的能力。并且因为缺乏许多其它植物的信号通路，所以生长素信号的传递被影响了。它也允许了由大基因家族编码的复杂通路的研究。
- 转录控制合成的传感器，可以使用合成促进剂和/或转录因子。红灯控制综合开关也使用拟南芥光敏色素相互作用因子6（pif6）的最小启动子上游。红色的光将光敏色素B（phyB）激活为主动远红形式，从而诱发其pif6变异。当与一个激活域phyB结合到DNA结合结构域时激活链接pif6报告基因在烟草原生质体上表达（图2C）。该开关可以有效地被远红光控制。



- A. 用于监测酵母中生长素诱导的植物吲哚-3-乙酸 (IAA) 降解的装置。该生长素受体F-box蛋白TIR1 / AFB2和YFP-IAA杂合体在各种酵母菌株中强烈表达。表达TIR1 / AFB2的酵母菌株配合YFP-IAA和IAA的外部刺激导致植物来源的IAA通过生长素与TIR1 / AFB2的结合，从而导致YFP-IAA的泛素化和降解。
- B. 用于监测植物中生长素诱导的降解比例的发光传感器。两个发光报告基因通过18个氨基酸的病毒2A连接肽连接，其允许三个拟南芥IAA的亚基II的两个报告基因共同翻译，胞内外切割13个氨基酸的最小降解序列基因。生长素与降解序列的结合导致拟南芥原生质体中连接的报告基因分子2的降解，其可以被观察到能降低报告基因2相对于报告基因1的表达。
- C. 红光 (660nm) 照射将拟南芥植物色素B (PhyB) 转化为活性远红光模式，当基因分别与活化结构域 (AD) 和DNA结合结构域 (BD) 连接时，该异源二聚化导致由最小 (Min) 启动子和由BD结合的操纵子驱动的报告基因的表达激活。该开关可以被远红光 (740nm) 有效地关闭。

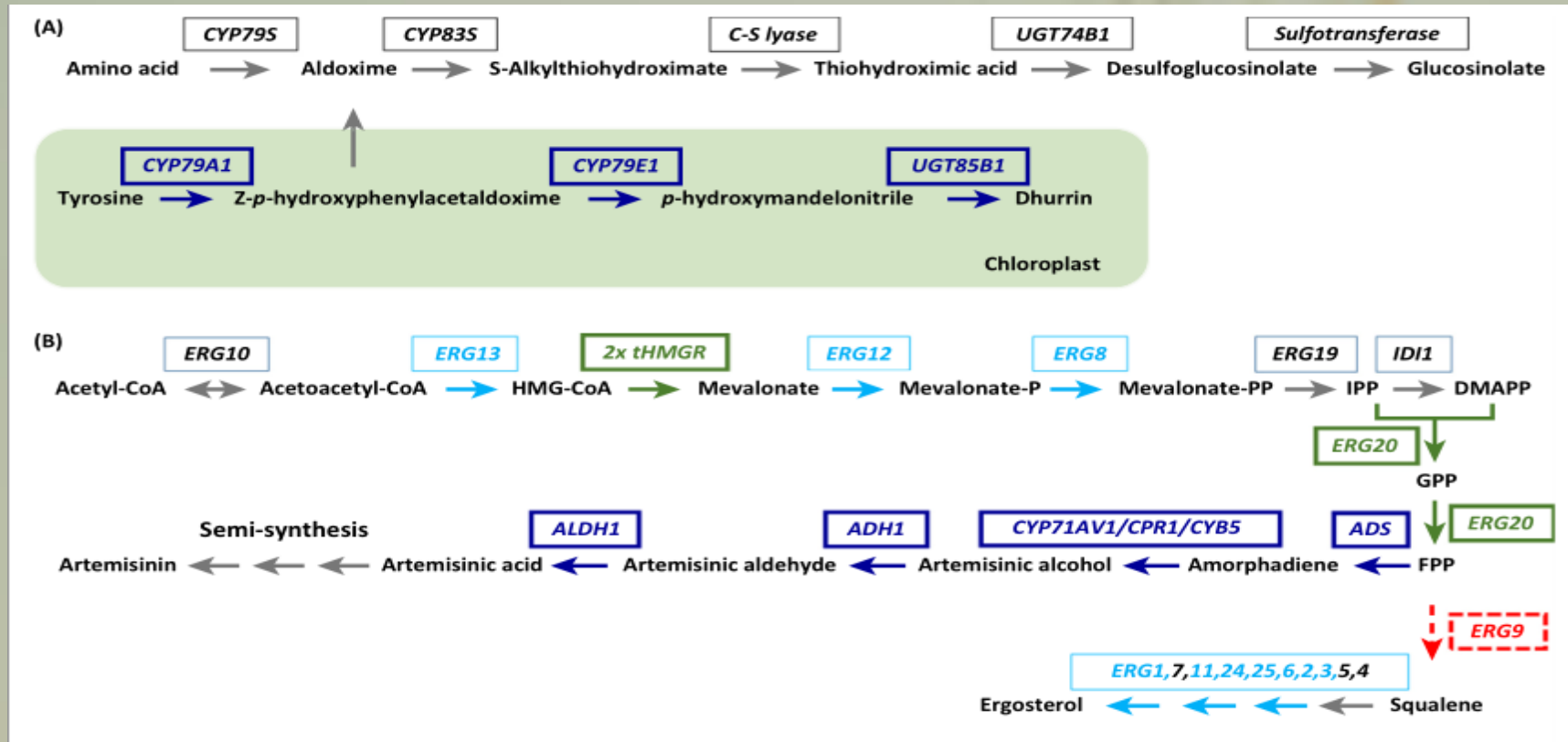


# 合成代谢途径

- 植物合成生物学的一个目标是建立合成代谢途径，用以生产大量的有价值的代谢产物，这些代谢产物难以以自然的方式获得或通过常规植物生物技术生产只能通过或昂贵或复杂的化学方法合成。构成生物合成途径的单个酶的表达可以以新颖的方式改变。
- 此外，整个合成生物的合成途径可以构建新的化合物产生。例如，一个迷你途径合成的细菌含有三欧文氏菌基因编码八氢番茄红素合成酶表达的组织特异性，八氢番茄红素脱氢酶，和番茄红素 $\beta$ -环化酶块茎特异启动子控制下导致黄金块茎马铃薯中类胡萝卜素含量增加20倍， $\beta$ 胡萝卜素增加3600倍(Figure 3C)。转基因高粱表达拟南芥的整个生物合成途径导致4%干重的蜀黍苷的积累。植物的二根血氢碱在酵母中通过一个10基因通路的重建而生产(Figure 3D)。
- 提高关键酶的活性，从而使代谢产物的通量达到生产所需的要求是合成代谢途径建设的关键点。广泛地了解有用的次生代谢产物的生化途径和网络是必要的。在未来的植物代谢工程中，了解植物代谢是同样重要的。这在今后的基因组规模的代谢模型和代谢通量分析中有指导性的意义。

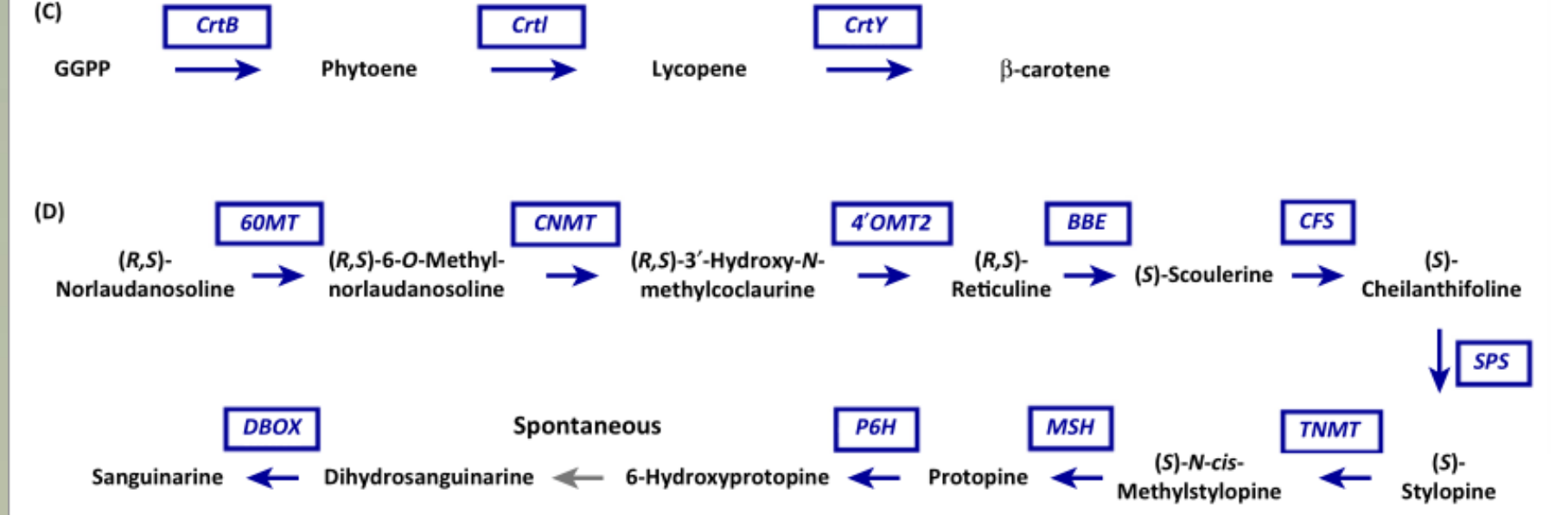
# 合成植物基因组

- 建立全新的基因组学是合成生物学的一个意义重大的目标。继开创了携带合成的1.08 Mb支原体基因组的细菌细胞的建设工作，以及染色体IX的右臂和酵母中染色体VI的一部分的合成，我们已经开发了合成基因组的三个设计原则：（1）所得合成基因组应具有（近）野生型表型和适应性；（2）它们不应含有不稳定元素（tRNA基因和转座子）；和（3）它们应该有未来研究的遗传灵活性（例如：基因组编辑位点）。虽然在遥远的未来，将流线型基因组部署到植物中仍然将是植物合成生物学中的重要成就，并且主要受限于对最小基因组所需的最小基因集合的了解不足。与合成基因组的合成相比，在不同宿主中的成功实现合成基因组将是非常具有挑战性的。因此，从已经流线化的基因组开始，开始植物合成基因组挑战是有意义的。
- 鉴于DNA合成和装配的巨大飞跃，原质体系的设计以及合成100-150 kb圆形基因组不再是技术挑战。目前还不清楚研究人员如何引入一个完整的合成原质体系，并取代细胞内的内源性原质体，但这一追求是当前要实现的目标。合成原质体系和质体的进展将使得有成本效益的和大规模生产的具有商业利益的酶和生物药物成功合成方法用于木质素合成的精密工程，将叶绿体中的蜀黍苷产生的光合还原能力耦合，以及生物活性天然产物（即青蒿素，类胡萝卜素，蜀黍苷，生物碱和香草醛）的生物合成成为可能。



- A.用于生产烟草属烟草叶绿体中的氰基葡萄糖苷蜀黍苷的合成途径。包括细胞色素P450依赖性途径的三种高粱（高粱双色）酶（两种P450，CYP79A1和CYP71E1以及UDP-葡萄糖基转移酶UGT85B）重新定位到本氏烟草叶绿体，导致叶绿体中整个蜀黍苷途径（蓝色箭头）的表达。预先存在的硫代葡萄糖苷生物合成途径（灰色箭头）使用CYP79A1产生的对羟基苯基乙醛肟来生产硫代葡萄糖苷。内源性肟代谢酶CYP83B1，C-S裂解酶（SUR1）和UGT74B1，CYP79E1的存在阻止了硫代葡萄糖苷的生成。
- B.一种在酵母中产生500倍的作为抗疟药物前体的半萜类青蒿酸的合成途径。来自直接或间接上调或抑制的酵母中内源性的甲羟戊酸途径的基因以浅绿色，浅蓝色和红色显示。在青蒿中从FPP到青蒿酸的生物合成途径被引入用于青蒿酸生产的酵母中，显示为蓝色。





- C.一种能使 $\beta$ -胡萝卜素（即前维生素A）的产生增加3600倍的合成细菌微通道。这个迷你途径在块茎特异性启动子控制下含有三种编码八氢番茄红素合酶（CrtB），八氢番茄红素去饱和酶（CrtI）和番茄红素 $\beta$ -环化酶（CrtY）的欧文氏菌基因导致马铃薯（*Solanum tuberosum*）中的金黄块茎。
- D.重建血根碱生物合成途径前体（R，S）-诺拉丹诺宁至酵母中的血根碱。十种异质基因来自罂粟（*Papaver somniferum*），除P6H外Es藜（*Eschscholzia californica*）代谢物以黑色显示，异质酶以斜体蓝色字的方块显示。缩写：ADH1，醇脱氢酶；ALDH1，醛脱氢酶；ADS，紫穗槐二烯合酶基因；BBE，小檗碱桥酶；CFS，青霉素合成酶；CNMT，科克拉宁N-甲基转移酶；CrtI，八氢番茄红素去饱和酶/胡萝卜素异构酶；DBOX，二氢苯并菲啶氧化酶；DMAPP，二甲基烯丙基焦磷酸盐；GGPP，香叶基香叶基二磷酸酯；GPP，焦磷酸香叶基酯；IPP，焦磷酸异戊烯酯；MSH，（S）-顺式-N-甲基维甲酸14-羟化酶；P6H，protopine-6-羟化酶；SPS，stylophine合酶；tHMGR，3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A还原酶；TNMT，四氢丙泊嗪顺式-N-甲基转移酶；4'OMT2，4'-O-甲基转移酶2；6OMT，6-O-甲基转移酶。

## Box1：突出的问题

- 我们如何将目前的简单设备扩展到更大的更复杂的合成生物系统同时最小化不期望的网络的大小和复杂性的增加？

设计的模拟计算机模型如何显著改善，以使得合成通路可以更好地满足固有的生物变异性，不确定性和进化？

这种植物合成方法的优点和缺点是什么？

我们是否能够像我们设计汽车和电脑一样构建合成植物？

我们离从头建造一个活的合成植物还有多远？

植物合成生物学的产品应该如何受到监管？

植物科学界可以有效地传达新产物的风险和益处并产出给消费者吗？



# 结论和未来展望

- 尽管很微小，但现在植物合成生物科学界已经开始在应用微生物合成生物学原理和方法论并将其引入合成对人类和环境有益的植物启动子，基因，途径方面取得长足进展。
- 预计植物合成生物学将会在提升环境承载力和增加食品，生物燃料，代谢物，治疗剂方面发挥越来越重要的作用，甚至完全合成生命形式。
- 但它的进展是缓慢的，昂贵的，费力的。还存在有一些可能问题，比如生物模块有可能依赖其他模块而不具有独立性，并且不可能是完全可预测的，还有包括密码子优化，遗传不稳定性，基因组位置效应和调控不兼容性等兼容性问题。
- 为了克服这些障碍和局限性，研究需要改善和提升植物合成生物学的设计流程。开发更大的正交库，生物部件和模块可以分离，优化网络构成组成的部件和模块，突变库筛选，定向进化，更加合理的设计，更好的算法，模型和软件将有助于将有助于植物合成生物学的重大进展。

- 令人鼓舞的是，欧洲国家已经开始支持植物合成生物学项目。
- 美国能源高级研究机构资助了他们的植物合成计划来替代石油。
- 英国商业部（BIS），英国研究委员会（RUCK）等英国基金已投资各种植物合成生物学方案。
- 有争议的是，由于转基因生物受到严格管控，对于合成生物学植物的监管应该如何下手？它在农业中的潜在价值能够最大化吗？
- 希望能够看到相关合成植物生物学界的科学家扩大与民间的有效交流。

Thanks for watching