

文章编号: 1004-0374(2011)09-0844-05

# 合成未来: 从大肠杆菌的重构看合成生物学的发展

王倩<sup>1</sup>, 康振<sup>2</sup>, 梁泉峰<sup>2</sup>, 祁庆生<sup>1,2\*</sup>

(1 山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100; 2 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要:** 合成生物学 (synthetic biology) 是伴随着基因工程、系统生物学以及生物信息学的发展而出现的一个新的交叉学科。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为一种宿主在合成生物学的发展中功不可没。从某种意义上讲, 合成生物学的每一次进展都离不开大肠杆菌。从大肠杆菌的角度出发, 对合成生物学的发展进行深入分析, 并提出了合成生物学在中国发展的重点。

**关键词:** 合成生物学; 大肠杆菌; 底盘生物; 重构

**中图分类号:** Q939.9; R378.2; O621.35 **文献标志码:** A

## Future of synthetic: Development of synthetic biology in the view of *Escherichia coli* reconstruction

WANG Qian<sup>1</sup>, KANG Zhen<sup>2</sup>, LIANG Quan-Feng<sup>2</sup>, QI Qing-Sheng<sup>1,2\*</sup>

(1 National Glycoengineering Research Center, Jinan 250100, China; 2 State Key Lab of Microbial Technology, Jinan 250100, China)

**Abstract:** Synthetic biology is an inter-discipline that appeared with the development of genetic engineering, system biology and bioinformatics. As a host, *Escherichia coli* played an important role in the development of synthetic biology. Therefore, this review summarized the recent development of *E. coli* as a host of synthetic biology.

**Key words:** synthetic biology; *Escherichia coli*; chassis; reconstruction

合成生物学是从生物学中分支出来的一门基于量化和工程化的学科。合成生物学意在通过理性设计、合成生物元件进而组装成生物系统, 最终实现生物系统工程标准化。第一代合成生物学的研究内容主要为标准调控元件的设计与合成; 而目前第二代合成生物学所研究的内容扩展为通过系统生物学的指导, 理性组装各种合成生物元件为定向执行某种生物功能的系统或者一种全新的细胞。重塑生命是合成生物学这一科学的核心思想及最终理想<sup>[1]</sup>。而其中心是从零开始建立微生物基因组, 从而改变和扩展自然界在 35 亿年前建立的基因密码。通过合成生物学, 人们不仅建立了模拟物理学的基因电路, 包括双稳态开关、振荡器、逻辑门等, 而且通过重新构建生物系统网络, 最终希望解决诸如生物能源、生物材料、生物医药以及疾病诊断、基因治疗等关系国计民生的大问题。

### 1 大肠杆菌——优异的底盘生物

合成生物学中的底盘生物是合成生物学的“硬件”基础, 然而, 细胞的复杂性为生物系统的工程化提出了挑战, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为最简单的模式生物, 由于其背景清晰、生长快速、易于操作, 在基础生物研究以及生物技术应用方面有着其他模式生物无可比拟的优越性。例如重组 DNA 技术以及分子生物学工具的应用都是在大肠杆菌中发展并拓展至其他生物中的。在合成生物学研究中, 大肠杆菌更是功不可没, 是当之无愧的底盘生物。近年来, 随着大肠杆菌在系统代谢工程及

收稿日期: 2011-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070092); 国家重点基础研究发展计划(“973 项目”)(2011CB707405)

\*通信作者: E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

多种组学技术领域突飞猛进的发展, 大肠杆菌的合成生物学正在迅速发展。

首先, 为了减小细胞内冗余的代谢网络以及提高其代谢网络的可预测及可控性, 人们开始对大肠杆菌的基因组进行缩减。基因组的减小是合成生物学中的重要问题。而基因组的最小化有两条途径: 一条是从头合成途径, 即通过 DNA 合成技术来精确合成目的序列的基因组。其中, 脊髓灰质炎病毒的基因组<sup>[2]</sup>、phiX174 噬菌体的基因组<sup>[3]</sup>以及生殖支原体 (*Mycoplasma genitalium*) 的基因组已成功合成并组装<sup>[4]</sup>; 另一条是精确删除现有微生物基因组中上述引起 DNA 不稳定的 DNA 片段和非必需功能的基因。Blattner 研究组通过序列比对, 精确删除 *E. coli* MG1655 基因组中上述引起 DNA 不稳定的 DNA 片段和非必需功能的基因, 例如与感染人宿主相关的基因以及应对特殊环境的相关基因。将 *E. coli* MG1655 菌株的基因组减少 15.27%, 获得的菌株在丰富培养基上的生长速度没有明显降低, 并且较野生菌具有更好的染色体及染色体外 DNA 分子的遗传稳定性、更高的电转化效率<sup>[5]</sup>。这一研究成果说明了具有最小基因组细胞的可行性。最小基因组既能够为细胞的生长和繁殖提供必要的分子机制和能量, 又减少了不必要的代谢途径、基因调控环路和非必需功能基因, 减少宿主细胞的遗传背景, 提高代谢效率, 为实现利用最小基因组细胞工厂生产能源和生物基化学品提供了重要基础<sup>[6-7]</sup>。值得注意的是作为合成生物学或者工业生物技术中具有应用价值的最小基因组的概念不是指能在特殊条件下 (例如必须加入许多营养因子) 生存的理论最小基因组, 而是指能够在最简单培养基中生存、在简单碳源中生长和能够应对压力条件的最小基因组。因此, 我们认为这种最小基因组可以叫做“最适基因组”, 它可以用于实际。

## 2 大肠杆菌合成生物学的基础

合成生物学的核心观念认为生命的所有零件都能由合成 (即化学法) 而制造, 进而通过工程化并组装成实用的生物组织。合成生物学致力于将这些生物零件根据工程设计原理赋予其工程学上的模块化性质, 每一个生物学零件都有详细的生物学特征描述, 可以在更大规模的设计中与其他元件进一步组合成具有特定生物学功能的生物学装置 (Device)。就像工程师利用已有的物理学原件, 根据物理学原理设计电路, 进一步组建有功能的集成电路, 甚至

中央处理器一样, 合成生物学工作者可以利用标准化的元件和装置设计和实现更大规模的生物工程学改造, 最终形成生物系统。

因此, 合成生物学的特点之一就是标准化和简便性, 即利用标准化的生物学元件, 可以简便地实现大规模的生物学途径的构建, 达到生物合成的目的。因此, 合成生物学的关键就是建立标准化的生物零件 (Biobrick)。通过建立一系列的标准化的生物学基本元件和复合元件, 包括启动子、复制子、抗性筛选标记以及一些调控元件, 使生物合成更加简便易行, 更加适合工程化。建立具有通用性和标准性的元件, 适合合成生物学家索取是合成生物学基础研究的重点。

目前, 已有 2 000 多种生物元件被合成并注册 (Standard Biological Parts Knowledgebase)([http://part-registry.org/Main\\_Page](http://part-registry.org/Main_Page))。这其中大多数是大肠杆菌的元件, 总体上生物元件可以分为三类: 基因表达的调控元件, 包括 Promoter (启动子)、Terminators (终止子)、Inverter (变极器)、Ribosome Binding Sites (核糖体结合位点)、Riboswitch (核糖开关) 以及 RNA; DNA 序列及质粒载体骨架序列; 蛋白质结构域和蛋白质编码序列。标准生物元件的合成与注册大大方便了后续的相关研究。科研工作者根据不同的实验目的而很容易地选择不同的生物元件, 进而进行系统的重建与组装。通过组装生物调控元件, 可以在大肠杆菌中构建各种功能的基因线路, 如基因振荡器 (gene oscillator)<sup>[8-11]</sup>、计数器 (counter)<sup>[12]</sup>、逻辑门 (logic gate)<sup>[13-15]</sup>, 从而赋予大肠杆菌细胞更多的功能。另外, 为了有效组装各种生物元件, 一系列的组装构建载体<sup>[16]</sup>也应运而生, 从而使得表达载体的基本零件, 如启动子、复制子、抗性筛选标记甚至载体本身的替换简便易行, 简化了构建工作<sup>[1]</sup>。

## 3 大肠杆菌非自身产物的合成

大肠杆菌作为一种肠道杆菌, 其代谢仅能产生一些小分子的有机酸类物质和乙醇等物质。从代谢工程开始, 人们就试图在大肠杆菌中构建一些大肠杆菌原来自身不能产生的物质的途径。例如大肠杆菌不能产生聚羟基脂肪酸酯 (PHA), 人们通过表达聚羟基脂肪酸酯聚合酶在大肠杆菌中建立了 PHA 代谢途径<sup>[17]</sup>。通过一系列的改造, 大肠杆菌目前是合成聚羟基脂肪酸酯的宿主之一<sup>[18]</sup>。最近, 我们实验室还在大肠杆菌中构建了联产琥珀酸和 PHA 的途径<sup>[19]</sup>。而利用大肠杆菌合成青蒿素的前体则是合

成生物学的里程碑,即美国加州大学伯克利分校 Keasling 课题组的关于在大肠杆菌中重建合成途径发酵葡萄糖生产治疗疟疾的药物——青蒿素的前体——青蒿酸。该课题组将来源于细菌、酵母以及植物的 11 个酶促反应相关酶基因进行模块化并加以整合,通过基因表达调控以及代谢通量优化成功构建了发酵生产青蒿酸的工程化大肠杆菌<sup>[20-23]</sup>;并使青蒿素产量提高几百倍,生产青蒿素的成本大大降低,为解除非洲疟疾问题提供了廉价的药物。麻省理工学院 (MIT) Gregory Stephanopoulos 课题组的关于强效抗癌药物——紫杉醇合成途径的重构。通过优化中间基因的表达以及代谢通量,重构的大肠杆菌发酵葡萄糖生产紫杉醇的前体——紫杉二烯的能力与改造前相比提高了 15 000 倍,紫杉二烯产量达到了 1 g/L 的水平<sup>[24]</sup>。

生物能源领域也有许多很好的例子,最著名的报道有两个。其中一个是美国加州洛杉矶分校 Liao 课题组关于生产高级醇合成途径的构建,通过整合外源的 2-酮酸脱氢酶 KIVD(来自酿酒酵母、乳酸乳球菌或丙酮丁醇梭菌)和乙醇脱氢酶 ADH(酿酒酵母),利用大肠杆菌中氨基酸合成途径中的 2-酮酸前体,成功构建了发酵葡萄糖生产丙醇、丁醇等高级醇的生产菌株<sup>[25]</sup>;2011 年初,Liao 课题组报道了通过优化反式烯脂酰 CoA 还原酶,并重构了丁醇代谢途径,为正丁醇的积累提供充足的驱动力——还原型辅酶 NADH 以及乙酰 CoA,提高了正丁醇生产效率。最终培养基中可以生产出 15~30 g/L 的正丁醇,而此前的方法产量只有 1~4 g/L<sup>[26]</sup>。Keasling 提出了微生物代谢调控的模块法控制,利用合成的蛋白脚手架 (synthetic protein scaffold) 将代谢途径的相关酶类集中在一起,提高酶的效率,使酶在相同转化效率的情况下产物产率提高 77 倍<sup>[27]</sup>。他们通过基因工程方法对大肠杆菌进行改造,让它将单糖生成更复杂的生物燃料(可直接应用的生物燃料)——脂肪酯 (fatty esters)、脂肪醇 (fatty alcohol) 和蜡 (waxes)。他们进而又让大肠杆菌来分泌半纤维素酶,它是来自植物的生物质的一个主要成分,可以将纤维素转化为生物燃料<sup>[28]</sup>。后来,LS9 可再生石油公司独立在大肠杆菌中构建生产烷烃以及烯烃混合物的合成途径<sup>[29]</sup>。另外,美国哈佛医学院的 Silver 课题组在大肠杆菌中构建了一条生产生物氢的途径<sup>[30]</sup>。

因此,通过克隆一些非大肠杆菌的基因,使大肠杆菌能够产生原来自身不能产生的化合物。这样

就扩展了大肠杆菌的应用范围,同时也为合成生物学的产生和发展奠定了基础。

#### 4 利用大肠杆菌合成非天然产物

通过在大肠杆菌中构建非自身产物,使大肠杆菌成为一个合成大宗/精细化合物的生物炼制工厂 (Biorefinery Factories);而在大肠杆菌中合成非天然产物(生物不能合成的化合物)使大肠杆菌的合成生物学达到了新的阶段。

聚乳酸 (PLA) 是自然界生物无法合成的生物可降解塑料,日本北海道大学 Taguchi 课题组通过利用微生物天然产物 PHA 的合成途径,在大肠杆菌中另外引入乳酸脱氢酶 LDH、丙酰 CoA 转移酶 PCT,并通过 PHA 聚合酶 (PhaC<sub>ps</sub>) 的定向进化,最终实现了大肠杆菌发酵葡萄糖生产聚乳酸 (PLA)<sup>[31]</sup>;之后, Lee Sang Yup 组也报道了利用相同途径、不同人工改造的 PhaC 聚合酶来合成 P(3HB-co-LA) 共聚物,其中 LA 组分含量能够占共聚物总量的 70%<sup>[32]</sup>。

另外,Liao 在前期生产高级醇的基础上,扩展了工程大肠杆菌的代谢途径:首先,在现有途径的基础上,积累得到 (S)-2-酮-3-甲基戊酸(异亮氨酸合成的酮酸前体),由于其结构与 2-酮异戊酸(缬氨酸合成前体)相似,2-酮异戊酸在 LeuABCD 催化作用下可以将侧链延长一个碳,并依次循环递增为 C<sub>n+1</sub>:即 2-酮异己酸、2-酮异辛酸、2-酮异壬酸等。因此推断,(S)-2-酮-3-甲基戊酸、2-酮丁酸也可被 LeuABCD 循环延长碳链成 C6~C9 的酮酸。而每加一个碳,都会由底物谱广泛的 2-酮酸脱氢酶 (KIVD) 和醇脱氢酶 (ADH6) 催化将其转变为相应的 C5~C8 的高级醇。最终他们通过代谢途径的扩展和对 LeuA 特异性突变,实现了非天然产物长链脂肪醇的合成<sup>[33]</sup>。同年,Liao 还报道了大肠杆菌对非天然氨基酸——L-高丙氨酸的合成,利用进化的谷氨酸脱氢酶 GDH 的转氨基反应,创造了大肠杆菌利用 2-酮丁酸合成 L-高丙氨酸的新途径,工程化菌株发酵得到 5.4 g/L 的高丙氨酸,可以作为抗癫痫药物的前体<sup>[34]</sup>。化学品领域,美国麻省理工学院 Prather 课题组在大肠杆菌中构建了合成 D-葡萄糖二酸的途径<sup>[35]</sup>,德国马普研究所的 Wolfgang 课题组在大肠杆菌中构建生产戊烯二酸的途径<sup>[36]</sup>。

#### 5 利用大肠杆菌解决非生物学问题

作为合成生物学的底盘生物,大肠杆菌能够完

成许多难以想象的工作。例如, 大肠杆菌细胞含有上万种调节线路, 从转录、翻译至翻译后水平上都能够对环境信号进行感应和应对。而这些响应环境的终端元件通常集中在启动子以及它们相关的转录因子上, 包括我们所熟知的大肠杆菌 *lac*、*tet* 及 *ara* 操纵元的启动子, 通过感受环境中诸如乳糖、阿拉伯糖的存在来激活下游基因的转录。James Collins 创建了典型的基因线路——基因双稳态线路<sup>[37]</sup>, 通过用化学信号刺激细胞来诱导 A 基因表达, 从而抑制 B 基因表达; 而 B 基因的表达又会抑制 A 的表达, 在双稳态线路中加入诱导物, 可促使系统在两个稳定状态之间任意翻转。之后的研究中, Collins 将两个启动子各自创建了一个基因计时器 (genetic timer), 这是一个能使细胞从表达一个基因切换到表达另一个基因 (经过一定的时滞) 的系统。通过检测计时器, 他们将结果反馈给计算模型, 并预测从其他版本构建的计时器将会如何表现。这种具有计算功能的大肠杆菌是真正的生物计算机。

在大肠杆菌中, 至少存在 32 种双组分感应系统<sup>[38]</sup>。通过合成生物学改造大肠杆菌的感应系统, 可以实现大肠杆菌对不同物质的感应, 如对 trinitrotoluene (TNT)、L-Lactate<sup>[38]</sup> 以及  $Zn^{2+}$ <sup>[39]</sup>。2005 年, Voigt 课题组成功构建了一种由合成的感应激酶组成的、可感应不同状态红光的系统: 将双组分信号转导系统 EnvZ-OmpR 中 EnvZ 组氨酸激酶的结构域与藻青素 PCB 共价结合的脱辅基蛋白嵌合成为一个光敏部件。同时, 将 *lacZ* 基因置于 *ompC* 启动子 (依赖于 OmpR 而表达) 之后, 使得 *lacZ* 的表达受光调控, 当大肠杆菌接受光照时, 就会诱导 *lacZ* 表达产物半乳糖苷酶, 其与 S-gal 反应得到黑色沉淀, 最终实现了大肠杆菌的生物拍照功能<sup>[40]</sup>。洛桑大学 Der Meer 课题组开发了用于检测环境中砷的大肠杆菌<sup>[41]</sup>, 美国艾默里大学 Gallivan 课题组通过设计合成核糖开关 (riboswitch)<sup>[42]</sup>, 并筛选出受阿特拉津 (atrazine) 调控的核糖开关, 含有该编程的大肠杆菌可识别阿特拉津并启动阿特拉津的降解系统。2009 年, Ellington 课题组合成了一种用于检测边缘的组装程序, 并在大肠杆菌中成功验证<sup>[43]</sup>。

## 6 展望

大肠杆菌已经成为能源、化合物、材料及药物生产的重要平台, 合成生物学的发展促进了大肠杆菌代谢途径的重建<sup>[1]</sup>, 通过精确设计基因环路、重构代谢途径为大肠杆菌提供了新的代谢和生理功

能, 使其能够高产天然甚至非天然产物。在过去的十年里, 基于大肠杆菌的系统生物学得到了迅猛发展<sup>[44-46]</sup>。一系列的相关的系统生物学研究软件被报道<sup>[30,47-48]</sup>。随着计算机科学以及系统生物学软件的开发, 合成生物学的发展将变得更加迅猛。我们认为大肠杆菌利用可再生资源合成生物基化学品 (如高级醇、长链烷烃以及环境友好的生物塑料) 实现低成本高产生产是未来十年发展的重要目标。同时, 利用大肠杆菌合成一些自身不能合成, 而其他生物又很难提高产量的天然产物, 例如, 一些中草药, 是实现大肠杆菌合成生物学突破的关键。大肠杆菌合成生物学技术的突破会为其他生物的合成生物学的发展提供理论和方法的支撑。

## [参 考 文 献]

- [1] 王俊姝, 祁庆生. 合成生物学与代谢工程. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1296-302
- [2] 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): 1016-8
- [3] Smith HO, Hutchison CA 3rd, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15440-5
- [4] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, 319(5867): 1215-20
- [5] Posfai G, Plunkett G, 3rd, Feher T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312(5776): 1044-6
- [6] Sharma SS, Blattner FR, Harcum SW. Recombinant protein production in an *Escherichia coli* reduced genome strain. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 133-41
- [7] Lee JH, Sung BH, Kim MS, et al. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 2
- [8] Danino T, Mondragon-Palmino O, Tsimring L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 2010, 463(7279): 326-30
- [9] Ninfa AJ, Selinsky S, Perry N, et al. Using two-component systems and other bacterial regulatory factors for the fabrication of synthetic genetic devices. *Methods Enzymology*, 2007, 422: 488-512
- [10] Stricker J, Cookson S, Bennett MR, et al. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature*, 2008, 456(7221): 516-9
- [11] Tigges M, Marquez-Lago TT, Stelling J, et al. A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature*, 2009, 457(7227): 309-12
- [12] Friedland AE, Lu TK, Wang X, et al. Synthetic gene networks that count. *Science*, 2009, 324(5931): 1199
- [13] Culler SJ, Hoff KG, Smolke CD. Reprogramming cellular

- behavior with RNA controllers responsive to endogenous proteins. *Science*, 2010, 330(6008): 1251-5
- [14] Tamsir A, Tabor JJ, Voigt CA. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical/wires/. *Nature*, 2011, 469(7329): 212-5
- [15] Win MN, Smolke CD. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. *Science*, 2008, 322(5900): 456-60
- [16] Anderson JC, Dueber JE, Leguia M, et al. BglBricks: A flexible standard for biological part assembly. *J Biol Eng*, 2010, 4(1): 1
- [17] Schubert P, Steinbuchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1988, 170(12): 5837-47
- [18] Li R, Zhang H, Qi Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2007, 98(12): 2313-20
- [19] Kang Z, Du L, Kang J, et al. Production of succinate and polyhydroxyalkanoate from substrate mixture by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2011, 102(11): 6600-4
- [20] Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. *Metab Eng*, 2009, 11(1): 13-9
- [21] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796-802
- [22] Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, et al. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 193-207
- [23] Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, et al. High-level production of amorpha-4, 11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4489
- [24] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70-4
- [25] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451(7174): 86-9
- [26] Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, et al. High titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli* enabled by driving forces. *Appl Environ Microbiol*, doi: 10.1128/AEM.03034-10
- [27] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753-9
- [28] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463(7280): 559-62
- [29] Schirmer A, Rude MA, Li X, et al. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*, 2010, 329(5991): 559-62
- [30] Rocha I, Maia P, Evangelista P, et al. OptFlux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering. *BMC Syst Biol*, 2010, 4: 45
- [31] Taguchi S, Yamada M, Matsumoto K, et al. A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(45): 17323
- [32] Jung YK, Kim TY, Park SJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(1): 161-71
- [33] Zhang K, Sawaya MR, Eisenberg DS, et al. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20653
- [34] Zhang K, Li H, Cho KM, et al. Expanding metabolism for total biosynthesis of the nonnatural amino acid L-homoalanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6234-9
- [35] Moon TS, Yoon SH, Lanza AM, et al. Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(3): 589-95
- [36] Djurdjevic I, Zelder O, Buckel W. Production of glutaconic acid in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 77(1): 320-2
- [37] Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-42
- [38] Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*, 2005, 13(2): 52-6
- [39] Dwyer MA, Looger LL, Hellinga HW. Computational design of a Zn<sup>2+</sup> receptor that controls bacterial gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20): 11255
- [40] Levskaya A, Chevalier AA, Tabor JJ, et al. Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature*, 2005, 438(7067): 441-2
- [41] Diesel E, Schreiber M, van der Meer JR. Development of bacteria-based bioassays for arsenic detection in natural waters. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394(3): 687-93
- [42] Sinha J, Reyes SJ, Gallivan JP. Reprogramming bacteria to seek and destroy an herbicide. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(6): 464-70
- [43] Tabor JJ, Salis HM, Simpson ZB, et al. A synthetic genetic edge detection program. *Cell*, 2009, 137(7): 1272-81
- [44] Hyduke DR, Palsson BO. Towards genome-scale signalling network reconstructions. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(4): 297-307
- [45] Kitano H. Computational systems biology. *Nature*, 2002, 420(6912): 206-10
- [46] Lewis NE, Hixson KK, Conrad TM, et al. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. *Mol Syst Biol*, 2010, 6: 390
- [47] Becker SA, Feist AM, Mo ML, et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 727-38
- [48] Papin JA, Price ND, Palsson BO. Extreme pathway lengths and reaction participation in genome-scale metabolic networks. *Genome Res*, 2002, 12(12): 1889-900