

文章编号: 1004-0374(2011)09-0875-07

利用合成生物学生产药物和燃料

王 猛, 赵惠民*

(Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA)

摘 要: 合成生物学是一个快速发展的研究领域, 其重要性体现在科学研究和应用开发两方面。它不但加深了我们对复杂的生物过程与机理的理解, 而且使得基础生物研究向实际应用的快速转化成为可能。将介绍一些新型高效的合成生物学工具以及如何利用它们开发能从可再生原料生产药物和燃料的工程菌株。

关键词: 合成生物学; 生物燃料; 代谢工程; 蛋白质工程; 基因调控

中图分类号: O621.33; Q816 **文献标志码:** A

Microbial synthesis of drugs and fuels via synthetic biology

WANG Meng, ZHAO Hui-Min*

(Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA)

Abstract: Synthetic biology is a rapidly growing research field of scientific and practical importance. It not only deepens our understanding of complex biological processes and mechanisms but also enables the rapid translation of fundamental biological research to practical applications. In this review, we will describe a few novel and highly efficient synthetic biology tools and their applications in the development of recombinant organisms capable of producing drugs and fuels from renewable feedstock.

Key words: synthetic biology; biofuel; metabolic engineering; protein engineering; gene regulation

随着能源危机的爆发和自然环境的持续恶化, 以石油为基础的药物和燃料生产工业越来越受到石油供给和价格的影响, 所以寻找可再生能源以代替石油成为药物和燃料生产原料的需求日益紧迫^[1]。尽管有机合成有了很大的发展并被广泛地应用于工业中, 微生物合成仍然是生产很多小分子化合物的更有效方法。这些小分子化合物涵盖了从简单的生物燃料到复杂的天然产物和药物。相比于有机合成, 微生物合成拥有众多的优点: 第一, 酶能够一步催化很多复杂的化学反应, 而这些反应往往需要很多步有机化学反应才能完成。第二, 由多个酶组合而成的代谢途径能免去中间产物的纯化步骤。而这些纯化步骤都是有机合成所不可避免的。最后, 微生物合成往往可以使用葡萄糖等便宜的原料, 从而使生产过程有利于环境保护。传统上, 微生物合成的设计、组建和优化的过程被定义为代谢工程 (metabolic engineering)。随着微生物合成在各个层

面都变得越来越复杂, 例如有更多的基因需要被加入到代谢途径中, 同时, 越来越多的多基因调控需要被考虑到, 代谢工程慢慢进化为一个更宽泛和先进的领域——合成生物学 (synthetic biology)^[2-3]。合成生物学更关注于系统化的设计和组建新的生物元件。例如酶、遗传线路 (genetic circuits)、代谢途径和细胞 (图 1)。在这篇综述中, 我们将介绍一些新型高效的合成生物学工具以及它们在药物和生物燃料的微生物合成领域的广泛应用。

1 合成生物学工具

1.1 蛋白质工程工具

蛋白质或者酶是合成生物学中最简单, 也是最

收稿日期: 2011-03-28

基金项目: National Institutes of Health (GM077596)

*通信作者: E-mail: zhao5@illinois.edu

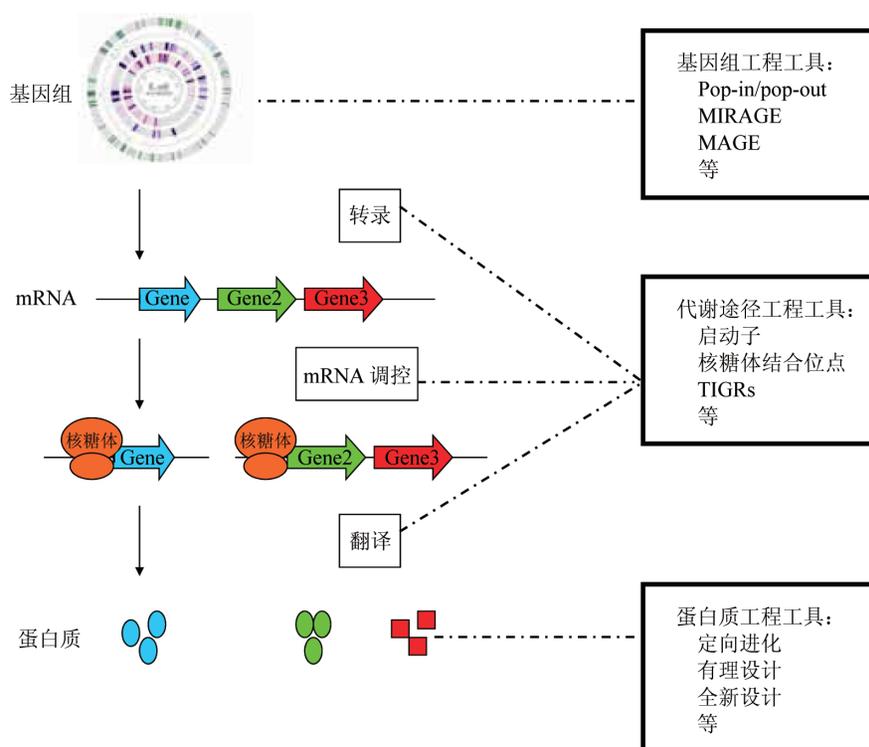


图1 适用于微生物合成药物和燃料的合成生物学工具

重要的生物元件，特别是在药物和生物燃料的微生物合成领域。考虑到经济效益和工业应用，酶需要满足更高的要求，如更高的催化效率和更高的稳定性。然而，自然界中天然存在的酶通常不能满足这样的要求。合成生物学工作者已开发一系列的工具用于寻找或创造这样的酶^[4]。其中定向进化 (directed evolution) 就是一个非常重要和有效的工具。在药物和生物燃料微生物合成领域，定向进化的目标往往是使酶能更有效而稳定地催化某一步化学反应。首先，通过易错聚合酶链 (式) 反应 (error prone PCR) 等突变方法产生目标基因的随机库，在特定的宿主中表达后通过使用高通量筛选 (high throughput screening) 或选择方法 (selection)，挑选得到具有更高目标性能的突变基因。然后，经过多轮的突变和筛选过程，有利突变得以积累和叠加，最终得到具有最好的目标特性的变异基因^[5]。

β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidases) 是一类能够催化 β -糖苷键水解的酶。这类酶往往对 β -糖苷类化合物具有混杂活性 (promiscuous activity)。它们在制造生物燃料^[6]及一些其他工业过程中有很重要的应用。例如 β -葡萄糖苷酶能水解纤维素二糖 (cellobiose) 为葡萄糖，而后者则能被发酵为包括乙醇在内的生物燃料。同时通过降低纤维素二糖的反馈抑制， β -葡

萄糖苷酶也被应用于提高纤维素降解效率。Hardiman 等^[7]用定向进化中 RNDM (random drift mutagenesis) 的方法产生了 β -葡萄糖苷酶突变库。通过荧光激活细胞筛选 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 方法，他们得到了一系列对不同 β -糖苷类底物具有更高催化活性的 β -葡萄糖苷酶。

虽然定向进化是一个对于提高酶的特异性非常有效的工具，但是作为定向进化模板的这种天然酶往往首先需要具有非常类似的活性。而另一方面，全新设计 (de novo design) 一种能催化特定化学反应的酶是很困难，但也非常有价值的工作^[8]，特别是在某些化学反应在自然界中还没有发现有酶能够催化的情况下，蛋白质全新设计这一工具更有无法比拟的先进性。例如，在自然界中还没有发现能催化 4-hydroxy-4-(6-methoxy-2-naphthyl)-2-butanone 的逆醇醛缩合 (Retro-aldol) 反应的酶。基于赖氨酸催化形成 schiff 碱或亚胺中间体的化学机理，Jiang 等^[9]通过计算机设计出了大量这类酶的蓝本。经过 RosettaMatch 算法优化后，他们选择了一共 72 种蛋白质设计方案并进行实验验证。这些设计基于 10 种不同蛋白质骨架，而每种设计有 8 至 10 个不同的氨基酸。结果基于不同蛋白质骨架的一共 32 种蛋白表现出了逆醇醛缩合反应活性。同时，通过

X 射线衍射确定那些活性蛋白的结构几乎和设计一模一样。这说明该全新设计方法的准确性和实用性很高^[9]。

综上所述, 定向进化和蛋白质全新设计各有互补的优缺点。定向进化的优势在于不需要大量关于模板蛋白的结构和功能的知识就能针对已有特定性能进行快速的改进; 而全新设计方法的优势在于创造能催化全新化学反应的酶。合理地同时运用这两种工具能发挥出更好的效果。例如, Rothlisberger 等^[10] 首先通过蛋白质全新设计得到了一系列能催化 Kemp 消除反应的酶。这类酶具有 $6\sim 160\text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 等不同的 $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 值。之后对这些蛋白质通过几轮定向进化的优化, 一些突变蛋白的 $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 值提高了 200 倍以上。

1.2 代谢途径工程工具

药物及生物燃料的微生物合成往往需要经过一系列酶催化的多步化学反应来实现。即使每一步反应都已经拥有良好的备选酶, 如何将它们组合成高效的代谢途径, 特别是如何平衡蛋白表达与活性以实现目标产物的产量最大化是非常大的挑战。与传统的分子生物学和细胞生物学相比, 合成生物学更适合于代谢途径的组建与优化。合成生物学首先将不同的生物元件组建成合适的代谢途径, 然后通过在不同层面(转录和翻译等)对代谢途径中不同基因的表达进行调控与优化, 从而达到目标产物产量最大化的目的。

在原核生物中, 因为基因表达的调控大部分通过转录水平的调控来完成, 启动子(promoter)在代谢途径的调控中能起到非常重要的作用。诱导型启动子(inducible promoter)是一类被广泛应用于基因表达调控的生物元件。通过加入小分子诱导物, 诱导型启动子能在合适的时候启动代谢途径中基因的表达, 以达到目标产物的产量最大化。除了研究和用最广泛的乳糖(lactose)和阿拉伯糖(arabinose)诱导型启动子^[11], 另有一些新的诱导型启动子被发现及应用, 如 Lee 和 Keasling^[12] 在 *Salmonella enterica* 中研究出了一套以丙酸为诱导物的可诱导表达系统, 得到了比广泛使用的 T7 启动子更好的基因调控效果。除了小分子诱导物, 光也能被用于诱导基因表达。Lindberg 等^[13] 利用光敏性 psbA2 启动子控制异戊二烯合成酶的表达, 成功达到了由光强度控制异戊二烯合成量。

在低价值化合物或药物的微生物合成过程中, 使用昂贵的诱导物不利于提高经济效益。这时组成

型启动子(constitutive promoter) 就比诱导型启动子更加实用, 而且定向进化方法能被应用于产生一系列具有不同强度的组成型启动子以达到对代谢途径的精确调控与优化^[14-15]。Alper 等^[16] 应用荧光激活细胞筛选方法(FACS)对噬菌体组成型 PL- λ 启动子的突变库进行筛选, 最终得到 22 个具有不同强度的突变启动子。为了评估这个启动子库的实际使用效果, 他们使用这些启动子对脱氧木酮糖磷酸合成酶(deoxy-xylulose-P synthase, DXS)的表达进行精确控制, 最终提高了番茄红素(lycopene)的产量。

在原核生物中, 除了启动子以外, 控制核糖体结合位点(ribosome binding sites)的强度是另一种重要的控制蛋白表达量的方法。Salis 等^[17] 开发出核糖体结合位点强度的预测算法, 这使得人为地通过调节核糖体结合位点强度对蛋白表达量进行精确控制成为可能。通过在大肠杆菌中测试超过 100 个核糖体结合位点的强度, 他们发现预测结果和实验结果相当吻合。

随着合成生物学的不断发展, 同时对多个基因进行精确调控的要求变得越来越普遍。使用不同的可诱导启动子对不同基因进行调控的方法已经被证明是可行的^[18], 但是可诱导启动子的数量限制和不同诱导物之间的干扰作用极大的限制了这一方法的广泛使用。另一种选择是使用定向进化的方法得到一系列能响应同一诱导物的具有不同强度的诱导型启动子^[19], 但同样的这种优化过的启动子库更加稀少。此外, 不基于启动子的工具也能被用于多个基因的调控^[20-21], 如 Alper 和 Stephanopoulos^[22] 开发了 gTME(global transcription machinery engineering)用于不同基因的同时调控。在概念型实验中, Global transcription machinery(特指 σ^{70})先通过随机突变然后被转入大肠杆菌中。三种不同的表型: 乙醇耐受性、代谢产物过量生产、多重表型被作为筛选目标。结果显示 gTME 方法比传统方法能更快更好地对表型进行优化和提高。

当然, 生物对基因调控的方式不仅限于转录水平。得益于近年来高速发展的关于 mRNA 结构和调控的研究, 合成生物学发展出通过不同 mRNA 调控元件对基因表达进行控制的工具, 如反义 RNA(anti-sense RNA)、核糖开关(riboswitch)和适配子(apptamer)都被成功应用于基因表达的调控^[23-25], 但这些工具的开发往往更多停留于基础研究, 真正应用这些工具对代谢途径进行调控和优化的例子还很稀少。在原核生物中, 多个相关基因往往被组合

成一个操纵子 (operon) 以达到某特定功能。合成生物学同样利用这一现象实现了利用一个启动子对多个基因进行调控; 但是由于多个不同因素, 如转录终止、mRNA 稳定性和核糖体结合位点强度, 都能对最终的蛋白表达量有影响, 所以, 这一基因调控方法的使用相对较困难。最近 Pfleger 等^[26] 成功开发出了能对同一操纵子内多个不同基因进行精确调控的新方法。这一方法通过产生和筛选包含 mRNA 二级结构、RNA 酶切位点和核糖体结合位点等调控元件的 TIGRs (tunable intergenic regions) 文库得到最优化的 DNA 序列。实验证明, TIGRs 能控制两个不同报告基因的相对表达量达到超过 100 倍的差别^[27]。通过在大肠杆菌中引入异源的甲羟戊酸合成途径, Pfleger 等^[26] 运用 TIGRs 方法平衡了这一合成途径中的三个基因的相对表达量, 最终甲羟戊酸的产量增加 7 倍。

通过适当的使用以上讨论的合成生物学工具, 我们能得到合适的生物元件, 例如高活性的酶、适合的启动子等, 同时, 我们也能通过组合这些生物元件设计出所需要的药物或生物燃料的合成途径。然而, 如何高效而准确地将设计转化为实际有效的 DNA 分子是另一个挑战, 特别是合成生物学正试图将它的设计能力推向更高更复杂的水平, 例如完整的基因组水平。最近, 大分子量 DNA 组装领域的研究和发展正引导我们向那个目标前进^[28-29]。最引人注目的成功例子来自于 Gibson 等^[30] 以化学合成的小分子 DNA 为原料并利用酵母强大的同源重组能力完成了 1.08 Mb 的 *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 基因组的设计、合成和组装。这一人工合成的基因组被转入到 *M. capricolum* 受体细胞内, 而实验证明这一新的 *M. mycoides* 细胞完全受合成的基因组控制。另一方面, 我们实验室也同时开发出了类似的 DNA assembler 方法^[31], 并运用这一方法进行代谢途径的组装以用于小分子产物的生产。除了利用酵母同源重组能力的方法, 其他的工具也被开发出来用于代谢途径的组装, 如 Sleight 等^[32] 利用 PCR 扩增的 BioBricks 和 Clontech In-Fusion PCR Cloning Kit 达到了快速而高效的 DNA 组装。这一方法能实现多个生物元件的组装、交换、删除等。

1.3 基因组工程工具

虽然大部分的合成生物学实验依赖于质粒等 DNA 载体, 但将代谢途径整合到基因组上具有独特的优点, 如相对于质粒等 DNA 载体, 基因组更加稳定。这一特性在药物和生物燃料的微生物合

成领域显得异常重要, 所以能对基因组进行精确修饰的工具就变得非常有用。除了经典的以质粒为基础的 pop-in/pop-out 方法^[33], 其他一些不同的基因组修饰方法也被开发出来^[34-36]。最近我们实验室开发了名为 MIRAGE (mutagenic inverted repeat assisted genome engineering) 的方法用于酵母基因组的修饰^[37]。首先通过同源重组, 含有抗性标记的 DNA 反向重复序列 (inverted repeat) 被整合到基因组上。由于在基因组上的不稳定性, 反向重复序列能催化自身从基因组上脱离, 最后得到基因组的精确修饰。相比于其他方法, MIRAGE 只需一次 DNA 转化步骤, 并且不留下疤痕, 因而更快速也更有效。基因组的精确修饰工具虽然非常重要, 但它往往被限制于基因组上单个或有限基因的修饰。而随着合成生物学的发展, 对基因组不同位点的同步修饰能力变得越来越重要。Wang 等^[38] 开发了 MAGE (multiplexed automated genome engineering) 方法应用于基因组的大规模修饰编译及宿主表型的优化。他们通过 MAGE 对大肠杆菌中磷酸脱氧木酮糖 (deoxy-xylulose-P) 的合成路线进行了优化。以每天产生 43 亿基因组突变体的速度, 他们用仅仅 3 天就将番茄红素 (lycopene) 的产量提高了 5 倍。

2 合成生物学应用的重要举例

抗疟疾药物青蒿素 (artemisinin) 对多抗药性的 *Plasmodium spp* 非常有效, 但是它的低供应量和价格限制了它的广泛使用^[39]。这使得微生物合成青蒿素 (artemisinin) 的先导物青蒿酸 (artemisinic acid) 非常具有吸引力。Keasling 实验室用合成生物学工具对青蒿酸的微生物合成进行了广泛而深入的研究 (图 2)。他们首先致力于优化中间产物 amorphaadiene 的生产。不同来源 (大肠杆菌、酵母和 *Artemisia annua*) 的基因被组合成以诱导型启动子控制的三个操纵子。这三个操纵子分别用于表达甲羟戊酸、焦磷酸法呢酯 (farnesyl pyrophosphate) 和 amorphaadiene 代谢途径。经过运用 TIGRs 等合成生物学方法对这一代谢途径进行多轮的优化后, 最近的结果显示 amorphaadiene 能达到最高 27.4 g/L 的产量^[40-41]。而通过引入 amorphaadiene 氧化酶 (AMO) 和相关的氧化还原辅酶 (cpr), amorphaadiene 能进一步被转化为青蒿酸。通过运用合适的启动子和载体进行优化后, 青蒿酸的产量超过 300 mg/L^[42-44]。另一方面, Keasling 实验室通过对来自于 *Bacillus megaterium* 的具有底物混杂性的 P450 酶进行突变

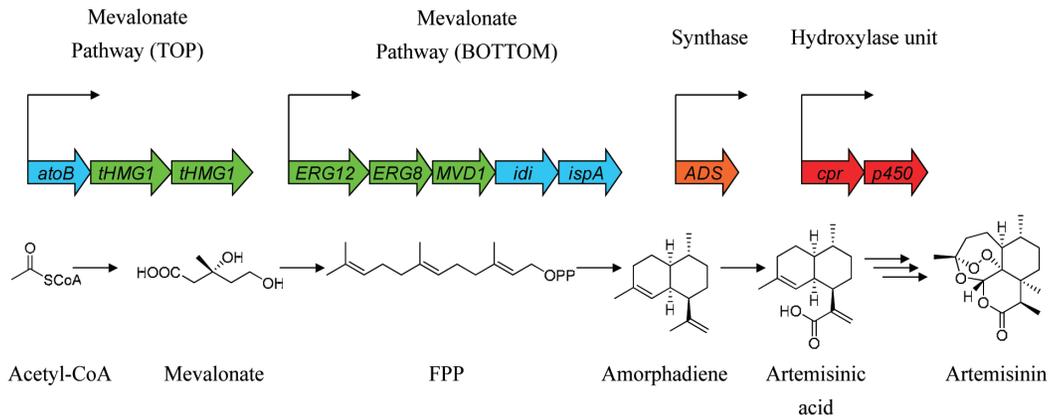


图2 微生物合成青蒿素

得到了能转化 amorphadiene 为 dihydroartemisinic acid 的突变 P450。通过使用这一突变 P450, 他们实现了青蒿素新的半生物合成路线^[45]。

虽然在生物燃料领域大部分的研究着重于乙醇的生物合成, 但是新型替代性生物燃料受到越来越多的关注^[46-47]。新型生物燃料包括长链醇、脂肪酸和烃类。例如正丁醇相对乙醇就是更好的生物燃料, 因为正丁醇含有更高的能量密度及更低的水溶性。自然界中一些 *Clostridium* 物种能产生正丁醇。在大肠杆菌和酵母中异源表达正丁醇代谢途径取得了一定的成功^[48-49]。另一方面, Liao 实验室利用天然的氨基酸合成路线设计了全新的长链醇代谢途径。通过引入不同的丙酮酸脱羧酶 (2-keto-acid decarboxylase, KDC) 和醇还原酶 (alcohol dehydrogenase, ADH), 来自于不同氨基酸合成途径的丙酮酸中间产物能被高效地转化为长链醇。这些长链醇包括丙醇、正丁醇、2-甲基丁醇和 3-甲基丁醇等^[50-51]。例如正丁醇的前导物丙酮戊酸 (2-ketovalerate) 最初是由丙酮丁酸 (2-ketobutyrate) 通过 LeuABCD 途径产生的。后来他们使用来自 *Methanococcus jannaschii* 的柠檬酸途径更直接地生产丙酮丁酸。这一新的代谢途径使大肠杆菌不需要苏氨酸就能产生正丁醇, 而且柠檬酸合成酶 (citramalate synthase, CimA) 的活性还通过定向进化方法得到了提高。这使得正丁醇的产量提高了 22 倍^[52]。

3 结语和展望

合成生物学在过去的十年中得到了飞速发展。大量高效而实用的合成生物学工具被开发和应用用于药物和生物燃料的微生物合成。通过在不同层面 (酶、代谢途径和基因组) 对微生物合成过程进行设

计、调控和优化, 人们不仅能够生产全新的药物和生物燃料, 而且能够使目标产物的产量达到最大化。合成生物学在未来将面临很多机遇和挑战。为了使微生物合成的设计、实现和优化过程更加简单和快速, 人们已经在生物元件的标准化方面作出了一定努力^[53]。然而, 现在大部分研究中所使用的生物元件还不能很简单有效地运用于其他实验, 而且我们现阶段仍缺乏对于基因调控网络的深刻认识, 这使得生物元件在不同生物体系中的可预测性受到诸多限制。我们相信将来生物元件的开发与标准化将同步进行。而更多的合成生物学工具将被开发和应用用于药物和生物燃料的微生物合成。最后, 综合所有生物元件和合成生物学工具的数据库和计算机辅助软件^[54-55] 的出现将使得微生物合成的设计更加简单和易于实现。

[参 考 文 献]

- [1] Schubert C. Can biofuels finally take center stage? *Nat Biotechnol*, 2006, 24(7): 777-84
- [2] Bashor CJ, Horwitz AA, Peisajovich SG, et al. Rewiring cells: synthetic biology as a tool to interrogate the organizational principles of living systems. *Annu Rev Biophys*, 2010, 39: 515-37
- [3] Liang J, Luo YZ, Zhao HM. Synthetic biology: putting synthesis into biology. *Syst Biol Med*, 2011, 3(1): 7-20
- [4] Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, et al. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J*, 2009, 3(2): 243-51
- [5] Haseltine EL, Arnold FH. Synthetic gene circuits: design with directed evolution. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007, 36: 1-19
- [6] Galazka JM, Tian C, Beeson WT, et al. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science*, 2010, 330(6000): 84-6
- [7] Hardiman E, Gibbs M, Reeves R, et al. Directed evolution

- of a thermophilic β -glucosidase for cellulosic bioethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 161(1-8): 301-12
- [8] Samish I, Macdermaid CM, Perez-Aguilar JM, et al. Theoretical and computational protein design. *Annu Rev Phys Chem*, 2011, 62: 129-49
- [9] Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, et al. *De novo* computational design of retro-aldol enzymes. *Science*, 2008, 319(5868): 1387-91
- [10] Rothlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, et al. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*, 2008, 453(7192): 190-5
- [11] Lutz R, Bujard H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(6): 1203-10
- [12] Lee SK, Keasling JD. A *Salmonella*-based, propionate-inducible, expression system for *Salmonella enterica*. *Gene*, 2006, 377: 6-11
- [13] Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng*, 2010, 12(1): 70-9
- [14] Jensen PR, Hammer K. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(1): 82-7
- [15] Bell PJ, Davies IW, Attfield PV. Facilitating functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome using an EGFP-based promoter library and flow cytometry. *Yeast*, 1999, 15(16): 1747-59
- [16] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12678-83
- [17] Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(10): 946-50
- [18] Van Dien SJ, Keyhani S, Yang C, et al. Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(5): 1689-95
- [19] Jensen PR, Hammer K. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 58(2-3): 191-5
- [20] Kennedy J, Murli S, Kealey JT. 6-Deoxyerythronolide B analogue production in *Escherichia coli* through metabolic pathway engineering. *Biochemistry*, 2003, 42(48): 14342-8
- [21] Mutka SC, Carney JR, Liu Y, et al. Heterologous production of epothilone C and D in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2006, 45(4): 1321-30
- [22] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, 9(3): 258-67
- [23] Winkler WC, Nahvi A, Roth A, et al. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, 2004, 428(6980): 281-6
- [24] Carothers JM, Goler JA, Kapoor Y, et al. Selecting RNA aptamers for synthetic biology: investigating magnesium dependence and predicting binding affinity. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2736-47
- [25] Bayer TS, Smolke CD. Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(3): 337-43
- [26] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1027-32
- [27] Smolke CD, Keasling JD. Effect of gene location, mRNA secondary structures, and RNase sites on expression of two genes in an engineered operon. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 80(7): 762-76
- [28] Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA, 3rd, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat Methods*, 2010, 7(11): 901-3
- [29] Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51): 20404-9
- [30] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52-6
- [31] Shao Z, Zhao H, Zhao H. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(2): e16
- [32] Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, et al. In-fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2624-36
- [33] Scherer S, Davis RW. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 4951-5
- [34] Storici F, Lewis LK, Resnick MA. *In vivo* site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(8): 773-6
- [35] Langle-Rouault F, Jacobs E. A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(15): 3079-81
- [36] Noskov VN, Segall-Shapiro TH, Chuang RY. Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage (TREC): a seamless modification tool for genome engineering in yeast. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2570-6
- [37] Nair NU, Zhao H. Mutagenic inverted repeat assisted genome engineering (MIRAGE). *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): e9
- [38] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460(7257): 894-8
- [39] Enserink M. Infectious diseases. Source of new hope against malaria is in short supply. *Science*, 2005, 307(5706): 33
- [40] 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

- [41] 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
- [42] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-3
- [43] Chang MC, Eachus RA, Trieu W, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(5): 274-7
- [44] 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
- [45] Dietrich JA, Yoshikuni Y, Fisher KJ, et al. A novel semi-biosynthetic route for artemisinin production using engineered substrate-promiscuous P450(BM3). *ACS Chem Biol*, 2009, 4(4): 261-7
- [46] Connor MR, Atsumi S. Synthetic biology guides biofuel production. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 2010. pii: 541698
- [47] Peralta-Yahya PP, Keasling JD. Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnol J*, 2010, 5(2): 147-62
- [48] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 305-11
- [49] Steen EJ, Chan R, Prasad N, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb Cell Fact*, 2008, 7: 36
- [50] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451(7174): 86-9
- [51] Zhang K, Sawaya MR, Eisenberg DS, et al. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20653-8
- [52] Atsumi S, Liao JC. Directed evolution of *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase for biosynthesis of 1-propanol and 1-butanol by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(24): 7802-8
- [53] Smolke CD. Building outside of the box: iGEM and the BioBricks foundation. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(12): 1099-102
- [54] Cai Y, Hartnett B, Gustafsson C, et al. A syntactic model to design and verify synthetic genetic constructs derived from standard biological parts. *Bioinformatics*, 2007, 23(20): 2760-7
- [55] Cai Y, Wilson ML, Peccoud J. GenoCAD for iGEM: a grammatical approach to the design of standard-compliant constructs. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2637-44