

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-063

生物逆向工程设计在合成生物学中的应用

陈欣懋, 欧阳颀

(北京大学物理学院, 北京 100871)

摘要: 合成生物学是一门涉及生物学、生物工程学、系统生物学、数学、物理、化学与信息科学的新生的交叉学科。它的目的是在工程化思想的指导下有目的地、可预测地设计人造生命系统。经过近二十年的蓬勃发展, 合成生物学取得了重大成就, 但依旧面临复杂系统理性设计的困难。在系统生物学中, 运用数学物理等知识根据网络功能来研究功能背后网络结构的方法被称为逆向工程。系统生物学逆向工程的研究思路与合成生物学设计过程的一致性, 启发了我们利用逆向工程指导合成生物学的理性设计。逆向工程应用到合成生物学, 将大大降低复杂功能回路的设计难度。本文从合成生物学的设计思路与问题出发, 根据本文作者研究团队近十年来在逆向工程研究中的经验, 归纳总结了目前逆向工程设计在合成生物学中的应用方法, 包括网络穷举方法、子网络拼接方法、从离散模型到连续模型的方法, 论证了逆向工程指导合成生物学理性设计的可行性与有效性, 分析了目前逆向工程设计在合成生物学中的发展瓶颈。

关键词: 逆向工程; 合成生物学; 理性设计; 布尔网络; 网络穷举

中图分类号: Q61 **文献标志码:** A

The application of biological reverse engineering in synthetic biology

CHEN Xinmao, OUYANG Qi

(School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Aiming to purposefully and rationally design and construct predictable man-made life systems with pre-defined functions under the guidance of engineering principles, synthetic biology is an advanced interdisciplinary science by combining a broad range of methodologies from various disciplines, such as traditional biology, bioengineering, systems biology, mathematics, physics, chemistry, and information science. With the booming development for nearly two decades, great progress has been made in synthetic biology. However, there are a number of factors that should be taken into account for rationally designing complex systems, such as robustness and bifurcation. Because of the consistency between the research idea of biological reverse engineering and the design process of synthetic biology, we are enlightened to resolve these problems in rationally designing genetic circuits with

收稿日期: 2020-05-06 修回日期: 2020-05-16

基金项目: 国家自然科学基金 (11774011)

引用本文: 陈欣懋, 欧阳颀. 生物逆向工程设计在合成生物学中的应用[J]. 合成生物学, 2020, 1(1): 29-43

Citation: CHEN Xinmao, OUYANG Qi. The application of biological reverse engineering in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(1): 29-43

compley pre-defined functions with the help of reverse engineering In this review, based on the accumulated experience of our research group in reverse engineering, we started with engineering principles and design difficulties in synthetic biology, and then summarized the current methods of applying reverse engineering in synthetic biology, including network enumeration, sub-network combinations, the method from Boolean network model to continuous model. In addition, we proved the efficiency of combining reverse engineering with synthetic biology to rationally design biological complex regulation networks. Finally, we concluded with the analysis of bottlenecks for the application of reverse engineering in synthetic biology.

Key words: reverse engineering; synthetic biology; rational design; Boolean network; network enumeration

1 生物系统正向工程与逆向工程的研究方法

系统生物学着重关注生物系统的复杂相互关系^[1-3], 利用非线性动力学、复杂系统理论与统计物理等方法探索生物调控网络的特性, 包括生物调控网络的网络拓扑学特征、动力学特征、功能特征, 以及三者之间的相互制约关系。根据研究网络尺度等特点的不同, 我们可以选择不同的数学模型进行研究, 包括离散模型、连续模型, 随机模型、确定性模型等^[4]。这种根据已知的蛋白质、基因间的相互作用构建动力学方程, 研究系统的动力学性质、解释或预测生物调控网络的功能和现象的方法被称为正向工程。然而, 在更多时候, 人们并不了解生物系统中的具体相互关系, 仅能宏观测量到系统具有的特定功能。出于对生物调控网络结构的探索, 研究者运用数学物理等知识找到了可以根据网络功能来研究功能背后的网络结构的方法^[5-11]。这种根据功能探寻生物网络结构的方法与正向工程的思路相反, 因此被称之为逆向工程^[12-14]。

在系统生物学帮助我们深刻理解生物系统后, 研究者萌发了有目的地改造生命系统的想法, 并综合其他学科的思想从头设计并创造具有新功能的生命系统, 合成生物学应运而生。电子工程因自下而上的设计思路取得了重大的成功, 这启发了合成生物学借用这种思路进行自下而上的正向工程设计, 即借用电子学中数字电路设计的设计理念, 通过理性设计, 将元件组装成器件, 器件集成模块, 模块构建复杂的生物系统, 最终封装

在生物体中使其成为一个能执行预定功能的生物机器^[15-17]。基因振荡器^[18]与遗传双稳态开关^[19]是合成生物学在理论指导下合成的第一批生物元件, 它们的实现表明了理性设计生物元器件的可行性, 是“合成生物学的里程碑”^[20]。随后, 研究者发掘出了越来越多的标准元件, 并利用这些标准化的生物元件构建了多种多样的基本逻辑门^[21-26], 进一步组装构建了众多具有全新功能的生物系统, 如具有捕食者-猎物生态系统特点的大肠杆菌生态系统^[27]、能产生青蒿素的酵母细胞^[28-29]、具有巴甫洛夫条件反射的细胞^[30]、具有计算能力的哺乳动物细胞^[31]、揭示生物菌落迁徙进化中竞争规律的生物系统^[32]、利用协同组装实现复杂信号处理的酵母细胞^[33]、仅有单条染色体的酵母细胞^[34]等。合成生物学家在设计并创造这些全新生命系统的过程中进一步加深学习和理解了自然生命系统的运作规律。然而, 这种系统工程化的设计思想忽视了电子系统与生物系统的显著差异, 即简单系统与复杂系统的差异。复杂系统设计中必须重点考虑的系统与状态稳定性、分叉现象(涌现现象)及强关联性等, 都是目前正向工程设计没有考虑的。这些问题限制了合成生物学家对复杂功能生物网络的设计与实现。

逆向工程研究的思路与合成生物学设计过程具有一致性, 并可以解决或部分解决设计复杂系统所遇到的问题, 这启发了我们利用逆向工程指导合成生物学的理性设计。逆向工程应用到合成生物学, 将大大降低复杂功能回路的设计难度, 降低合成生物学功能回路的构建难度。

2 逆向工程指导合成生物学理性设计的方法

根据数学模型的不同, 逆向工程指导合成生物学理性设计的方法大体上可以分为基于微分方程的逆向工程和基于布尔网络的逆向工程。

2.1 基于微分方程的逆向工程

研究连续系统常用的工具是微分方程。微分方程模型是基于热力学极限的平均场模型。它将分子浓度当作连续变量, 用一阶常微分方程描述系统的动力学行为, 如式(1)。

$$\frac{dx}{dt} = \dot{x} = f(x, p, t) \quad (1)$$

式中, $x = (x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n)^T$; $p = (p_1, p_2, \dots, p_i, \dots, p_n)^T$; $f = (f_1, f_2, \dots, f_i, \dots, f_n)^T$ 。 x_i 表示节点 i 对应的浓度, p_i 为模型中的参数, f_i 为系统相互关系对应的方程形式。系统将根据初态和微分方程指定的约束条件在相空间中沿着确定的轨迹演化。

网络穷举是基于微分方程的逆向工程方法之一, 也是逆向工程设计网络结构的较为成熟的方法。通过限定研究网络尺度保留网络间相互作用的复杂形式, 网络穷举帮助我们寻找更多具有特定功能的未知网络结构, 加深我们对生物网络结构与功能关系的理解和研究。研究者通过目标功能提出相应的模型假设与目标函数, 在网络结构全空间中遍历计算所有特定节点的网络, 根据目标功能和适当的网络功能评价指标筛选出全局最优的网络结构。通常我们将网络功能的鲁棒性作为功能评价指标, 用来衡量网络功能对参数的敏感性。网络的鲁棒性越高, 功能抵抗参数扰动的能力就越强。在具体计算过程中, 常用 Q 值表征网络的鲁棒性, Q 值是网络参数在合理的参数空间下进行拉丁超立方随机采样^[35]时能够实现目标功能的随机参数的比例, 满足如式(2)条件。

$$Q = \frac{m}{n} \quad (2)$$

式中, n 为在参数空间中随机采样的总套数, 有 m 套随机参数能够实现目标功能。

网络穷举的方法因为能精确模拟动力学过程, 帮助我们探索具有目标功能的未知网络结构, 被

广泛应用在研究网络结构的设计中, 包括适应性^[36]、果蝇发育的极性建立^[37]、计量响应吻合性^[38]、自组织细胞极化^[39]、图灵斑图^[40]、振荡周期的温度补偿性^[41]、生物滤波器^[42]等。例如, 在适应性^[36]的研究中, 作者引入灵敏性(sensitivity)和适应准确性(adaptation precision)这两个特征量来定量刻画适应性功能。其中, 灵敏性指标是网络的响应输出最大值与初始输出值的比, 适应准确性是网络在输出状态恢复稳定后相对初始输出的比值的倒数, 用来表征输入信号变化前后对应的稳定输出信号的差异。具有适应性的网络应该具有对输入信号灵敏响应的能力(灵敏性 >1)和准确适应的能力(适应准确性 >10) (图1)。同时, 模型假设每个节点有激活和非激活两种可相互转换的状态, 且两种状态对应的蛋白质浓度之和是一定的。通过上述模型假设, 遍历计算所有可能的三节点酶促反应网络。在每一个网络拓扑结构的具体计算中, 研究者根据网络拓扑结构写出对应调控的微分方程组, 在参数空间进行拉丁超立方随机采样进而模拟动力学过程, 通过计算相应参数下的灵敏性和适应准确性这两个特征量, 来最终确定实现适应性的参数套数, 即网络拓扑结构的 Q 值 (图2)。通过表征网络鲁棒性的 Q 值, 研究者筛选出了能较好实现完美适应的最小网络, 分别是带有缓冲节点的负反馈网络(NFBLB)和非一致前馈网络(IFFLP) (图3)。

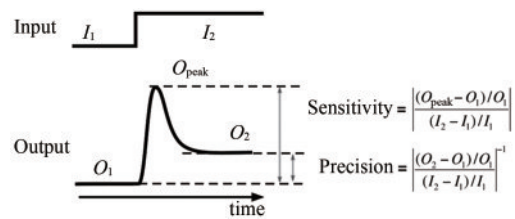


图1 适应性的数学描述^[36]

Fig. 1 Mathematical description of the adaptation function^[36]

虽然网络穷举的方法可以帮助我们理解网络功能与结构的关系, 但是目前计算机的计算能力限制了模型的进一步发展。对于三节点网络, 网络穷举法需要遍历计算 $3^3=19\ 683$ 个网络拓扑结构, 其中对于每一个网络结构, 当随机参数的采样数 $n=10\ 000$ 时, 总计算量将达到亿量级, 耗时若干天; 对于四节点网络, 网络穷举法需要计算 $3^{16}=$

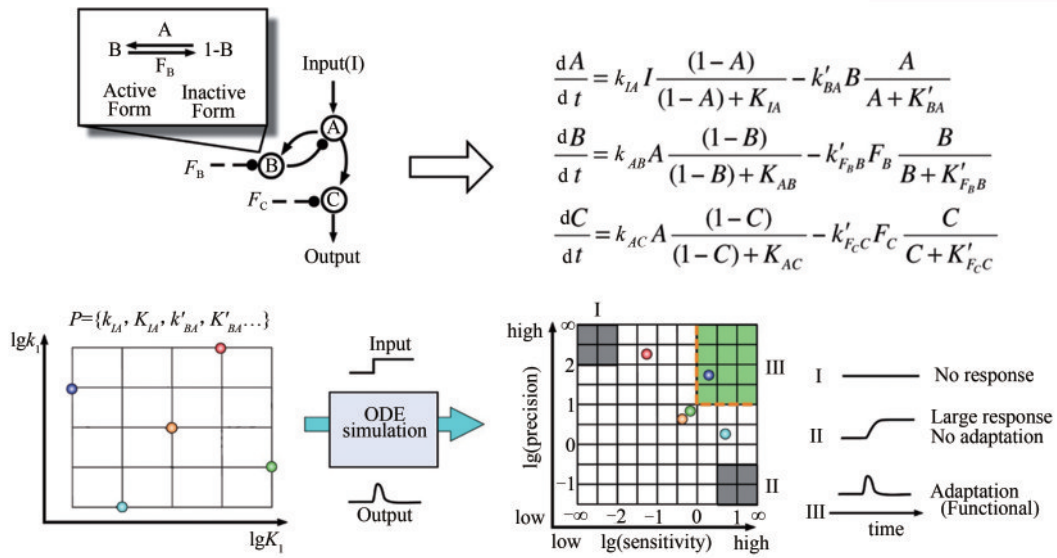


图2 网络穷举研究适应性功能的特定网络结构的计算过程^[36]

Fig. 2 Illustration of the calculation procedure for a given topology for adaptation^[36]

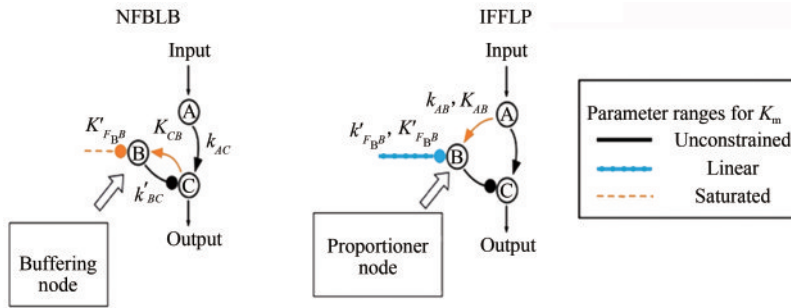


图3 能较好实现完美适应的最小网络^[36]

Fig. 3 Minimal adaptive topologies^[36]

43 046 721 个网络拓扑结构，如果每个网络结构选取 10 000 组随机参数进行计算，总计算量将达到千亿量级，完成计算大概需要至少 19 年时间。网络节点数的微小增加对计算能力的挑战是巨大的。因此，目前大多数的网络穷举方法只能用在节点数不超过 3 个的网络中。

但是复杂的功能通常伴随着复杂的网络结构出现，三节点网络并不能满足我们对复杂功能网络的研究需求。前人的大量研究表明，特定的调控模块被广泛使用在不同的生物系统中^[43-45]，这启发了我们可以从模块化的角度来研究具有复杂功能的生物网络。我们将网络穷举与模块化的思路相结合，提出了子网络合并的研究方法。这种方法削弱了网络穷举对研究网络尺度的限制，拓展了网络穷举方法的研究范围。该方法的核心思想是：先将复杂的目标功能拆分成若干简单的子功

能，然后利用三节点网络穷举的方法筛选出子网络，再根据子网络合并的方式将不同子网络中的节点合并以形成大的组合网络，最终从大的组合网络中挑选出具有目标功能且鲁棒性高的网络^[46]。例如，在设计具有巴甫洛夫条件反射的复杂功能的网络中，先将网络的总功能划分为记忆和响应两个子功能模块，用蛋白质相互作用和基因转录调控两个层面的网络穷举方法筛选出了合适的记忆网络和响应网络，然后将子网络合并后筛选得到最终具有目标功能的生物调控网络（图 4）^[47]。为了保证节点合并的合理性，引入的节点合并的逻辑限制主要在于被合并在一起的两个节点接收的输入信号间、调控关系间均不能相互矛盾，以及合并后的节点产生的输出信号间不能相互矛盾。节点合并时，分别从两个子网络库中各取一个网络，根据节点合并的逻辑限制，分别以合并

一个节点、两个节点以及三个节点的顺序模拟节点合并后的组合网络的功能，筛选得到最终具有目标功能的生物调控网络。与合成生物学实验中利用逻辑代数正向设计的巴甫洛夫条件反射调控网络相比，我们发现用子网络合并法得到的组合网络具有更高的鲁棒性，其 Q 值可以提高 1~2 个数量级，这凸显了逆向工程方法的优越性。此外，我们还将子网络合并的方法运用到具有多功能信号编码性质的信号传导网络设计中，找到了能在不同的刺激条件下分别产生振荡、适应性和持续性激活三种功能的网络结构，最终实现了多功能信号编码的信号传导网络^[48]。这种子网络合并的方法不仅扩大了生物调控网络的研究尺度（图 5），而且帮助我

们从复杂功能与简单模块的角度加深了对网络结构与功能的理解。

目前已经有许多逆向工程指导合成生物学理性设计的研究工作，但大部分工作停留在理论计算层面，缺乏后续的实验验证。合成生物学验证实验的缺乏让我们无法知道逆向工程可以对合成生物学理性设计的指导程度。这不仅阻碍了我们对复杂系统运行规律的进一步学习和理解，而且限制了合成生物学的发展，不利于合成生物学解决能源、资源、环境、医疗健康等问题。所以，将逆向工程的理论与合成生物学的实验结合起来显得尤为重要。我们首次将逆向工程的理性设计与合成生物学实验相结合，通过三节点网络穷举筛选出了具有超敏开关特性的生物调控网络，进

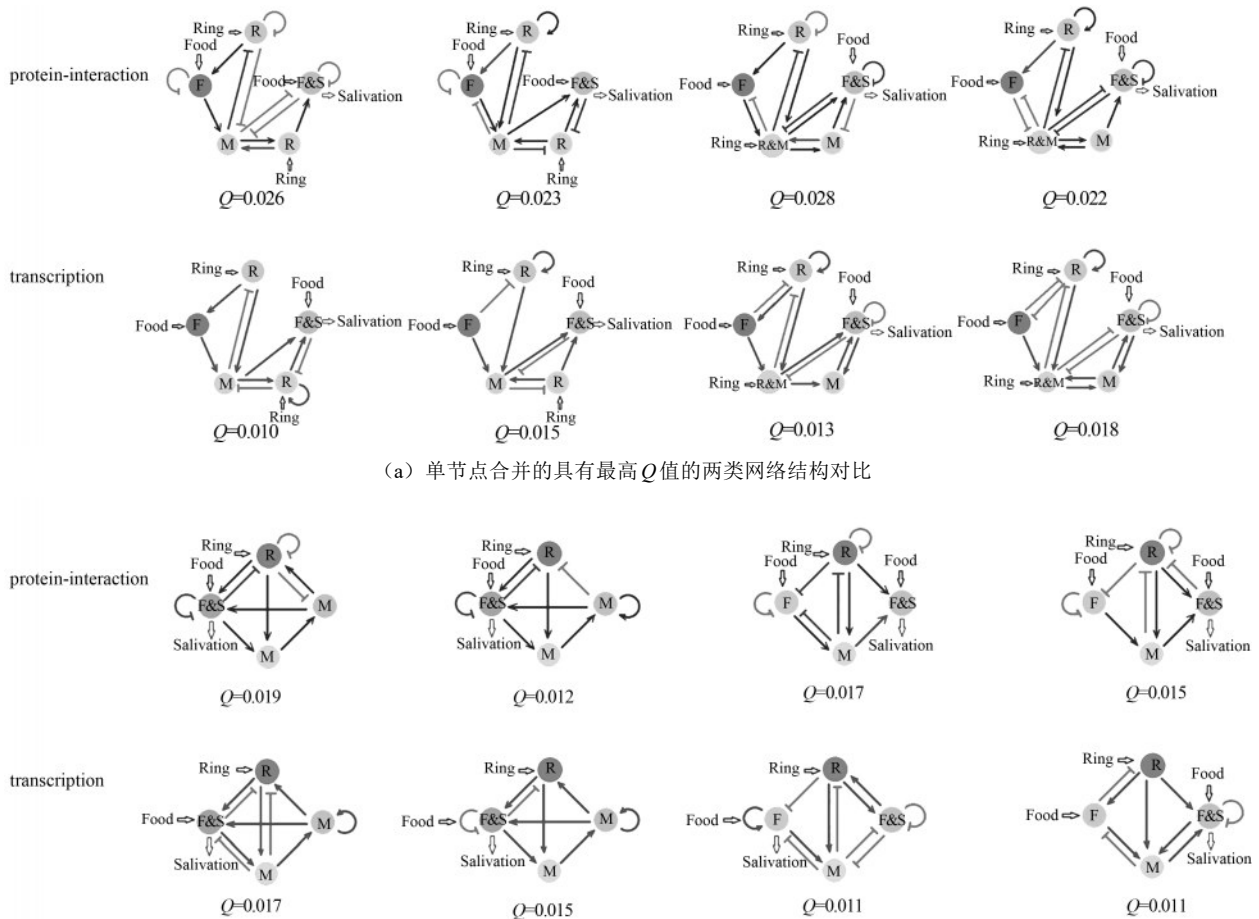


图 4 子网络合并法得到的最优调控网络^[47]

Fig. 4 Results of the robust sub-network combinations with high Q -value^[47]

(用蛋白质相互作用和基因转录调控两个层面的子网络合并方法得到的组合网络在结构上是相似的)

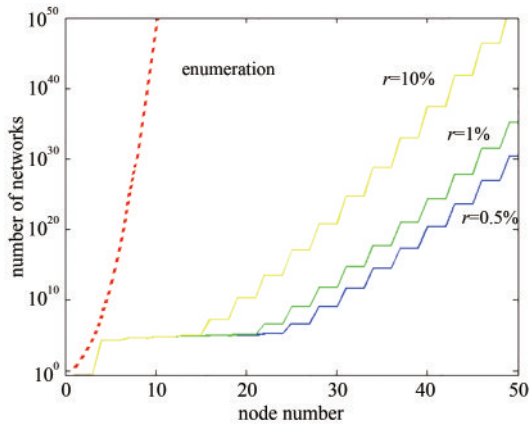


图5 传统网络穷举与子网络合并的计算复杂度对比^[47]

Fig. 5 The complexity comparison between traditional enumeration and sub-networks combination^[47]

(虚线表示传统网络穷举方法的计算复杂度随网络节点数的变化，余下折线对应子网络合并方法的计算复杂度的变化)

而利用合成生物学的手段实现了超敏细胞密度开关的理性设计，初步验证了逆向工程指导合成生物学理性设计的可行性(图6)^[49]。在研究中我们发现并非所有理论设计的网络都能在实验中被成功构建，所以需要依据实验经验进一步筛选网络。考虑到实验中需要使用的元件特性，我们提出了具体的实验可行性限制条件，即节点A、B对节点X($X=A, B, C$)的调控关系必须一致(图6)。我们将实验可行性限制条件引入到了网络穷举筛选网络的过程中，挑选出了既具有理论指导意义又具有实验可行性的网络结构库，并从中选取了相互作用最简单且鲁棒性最好的网络进行实验构建。为了实现从逆向工程到正向工程的过渡，我们对最简网络进行了理论计算分析，找到了超敏性能与在实

验上可以控制并调节的参数之间的约束关系，即节点A的自激活能力越强网络的整体超敏性能越好。进而根据理论分析的结果选取了满足参数理论要求的实验元件，精确组装出了具有可预测能力的超敏细胞密度开关，发现实验中参数对功能的影响符合理论预测(图7)，实现了仅用单个元件独自表征时的动力学参数就能预测元件组装后的基因线路功能与性能的目标^[50]。在结合理论计算与实验验证的过程中，引入实验可行性限制既在理论指导实验的层面上帮助实验从全局稳定性角度得到了鲁棒性最好的复杂网络结构设计，又在实验指导理论的层面上帮助理论计算从实验经验中抽象出了新的生物回路设计标准，进一步说明了逆向工程与正向工程的结合让系统生物学与合成生物学相互促进、共同发展。

2.2 基于布尔网络的逆向工程

微分方程模型虽然能够定量地描述网络动力学特征，但对计算能力的要求也很高。与连续模型的精细刻画不同，离散模型虽然在很多情况下只能给出定性或半定量的结果，但是可以帮助我们研究更大尺度的生物调控网络。布尔网络是最简洁的离散逻辑模型。布尔网络中的每个节点仅有“0”“1”两种状态，对应分子表达的高低两态，模型将节点间的调控关系简化成激活或抑制两种状态。 N 个节点的网络在任一 t 时刻，所有节点状态用长度为 N 的向量 $S(t)$ 表示，其中 S_i 分量表示节点 i 的状态， $S_i = 0$ (低态)和 $S_i = 1$ (高态)，节

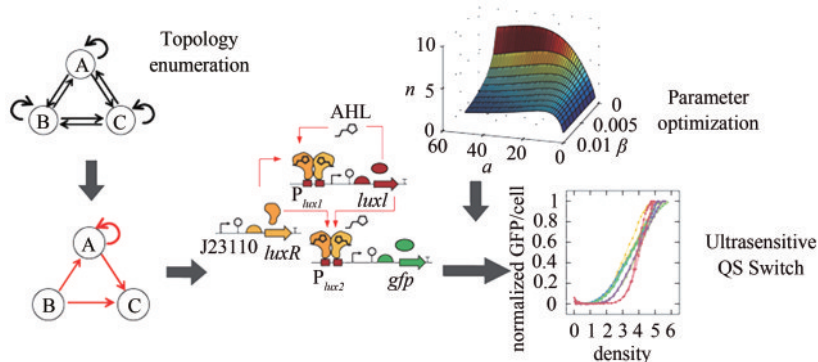
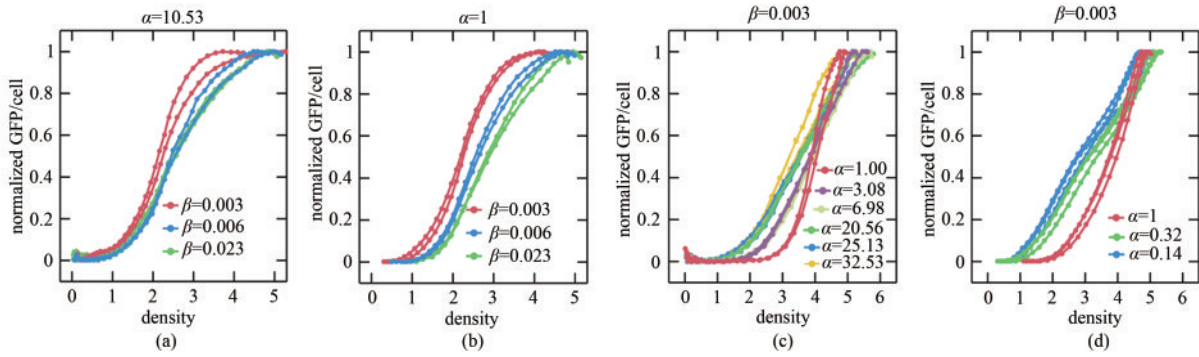
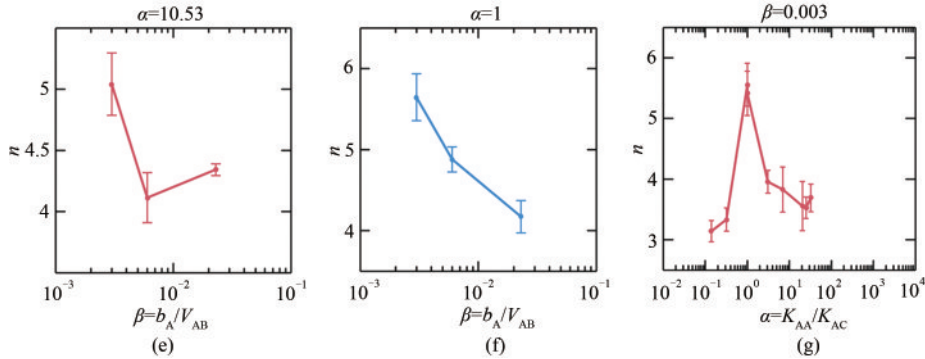


图6 网络穷举指导细胞密度超敏开关实验构建的流程^[49]

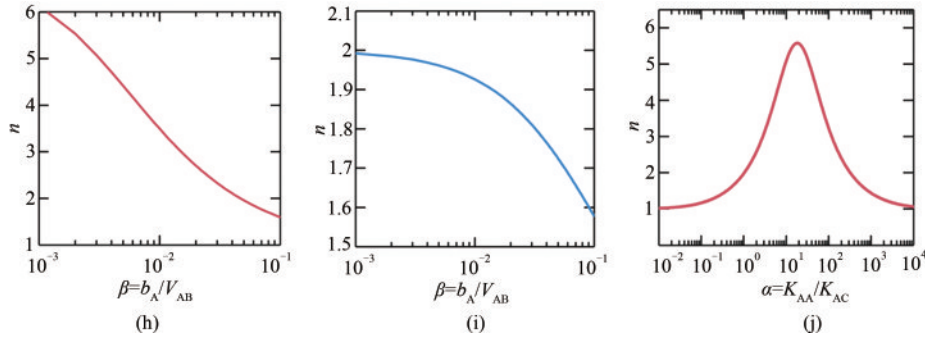
Fig. 6 The workflow of rational design guided by reverse engineering^[49]



(a) ~ (d) 为实验测量的不同参数元件组合下的细胞密度开关响应曲线



(e) ~ (g) 为对应 (a) ~ (d) 响应曲线的希尔系数拟合曲线，其中 (e) 对应 (a)，(f) 对应 (b)，(g) 对应 (c) 和 (d)



(h) ~ (j) 相应参数条件下的理论预测曲线

图 7 参数的理论预测与实验测量^[49]

Fig. 7 The comparison of prediction and measurements of parameters^[49]

[通过对比 (e) 与 (h)，(f) 与 (i)，(g) 与 (j)，发现理论设计方法具有一定的可预测性]

点间的相互作用由 a_{ij} 表示。节点状态的变化由布尔方程 $S_i(t+1) = F_i[S(t)]$ 确定，具体形式如式 (3)。

$$S_i(t+1) = \begin{cases} 0, & \sum_j a_{ij} S_j(t) < 0 \\ S_i(t), & \sum_j a_{ij} S_j(t) = 0 \\ 1, & \sum_j a_{ij} S_j(t) > 0 \end{cases} \quad (3)$$

由于模型的简洁性，布尔网络模型被广泛应用于基因调控网络和信号传导通路的全局动力学特性研究，例如，研究者构建了包含 11 个节点的芽殖醇

母细胞周期调控网络，用布尔方程的演化规则，遍历计算 2^{11} 种初始状态的演化，发现了所有的初始状态均演化到 7 个静止状态 (fixed point) 中的某一个，其中约 86% 的初始状态均演化到了 G₁ 期对应的稳态上，显示了生物网络的全局稳定性。另外，研究者还发现网络的动力学轨迹是一个一维中心流形，因而其生物学路径也是全局稳定的^[51]。

基于布尔网络的逆向工程方法将网络间的相互作用视作逻辑变量，根据网络中重要节点的动力学路径与布尔演化规则，推导生物调控网络的

反向公式, 进而获得网络的结构信息。具体而言, t 时刻的节点状态作为输入, $t+1$ 时刻的节点状态作为输出, 节点 i 对节点 j 的调控用逻辑变量 g_{ij} 和 r_{ij} 表示: 节点 i 抑制节点 j 时 $r_{ij} = \text{true}$, 否则 $r_{ij} = \text{false}$; 节点 i 激活节点 j 时 $g_{ij} = \text{true}$, 否则 $g_{ij} = \text{false}$; 节点 i 与节点 j 无相互作用时 $g_{ij} = \text{false}$, $r_{ij} = \text{false}$ 。由于节点 i 对节点 j 的调控是单一的, 不会同时存在激活和抑制, 故 $g_{ij} \cdot r_{ij} = \text{false}$ 。综合节点变化的所有情况, 我们有如式 (4)。

$$\begin{cases} S_i(t+1) = \\ \left[\sum_{j \neq i} (S_j(t) \cdot g_{ji}) + S_i(t) \cdot \bar{r}_{ii} + S_i(t) \cdot g_{ii} \right] \cdot \prod_{j \neq i} (S_j(t) \cdot r_{ji}) \\ r_{ji} \cdot g_{ji} = \text{false} \end{cases} \quad (4)$$

所有节点在整个动力学路径演化下均满足公式 (4)。通过利用强抑制模型 ($r_{ij} = -\infty$) 和具体的动力学信息对公式 (4) 进行求解, 方程组的解可以转化成析取范式形式 (仅以逻辑“与”连接各项的形式), 进而得到调控关系^[52-53]。

一般基于布尔网络的逆向工程方法需要从特定的动力学轨迹出发。由于动力学轨迹提供的网络约束是有限的, 当我们通过目标功能的一条动力学轨迹进行推导时, 将会得到一个数量庞大的可能网络库。为了得到尽可能小的可能网络库, 找到使可能网络数量减少最快的实验路径显得尤为重要。在确定的模型下, 网络的动力学轨迹由初态决定, 因此选择不同的初态对缩小网络库的范围非常重要。我们根据网络初态与动力学轨迹的关系, 提出了最大路径距离、轨迹熵和随机采样三种选取网络初态的方法, 用于探索寻找最优动力学轨迹^[54]。

最大路径距离法的基本假设是: 状态 i 如果距离某条动力学轨迹 Ξ 越远, 则 i 演化到该轨迹 Ξ 的时间越久, 演化过程中包含的网络结构信息就越多。定义状态 i 到轨迹 Ξ 的距离 D_i 如式 (5)。

$$D_i = \min_{j \in \Xi} (d_{ij}) = \min_{j \in \Xi} \left[\sum_k (S_i^k - S_j^k)^2 \right] \quad (5)$$

式中, d_{ij} 表示状态 i 到 Ξ 中状态 j 的距离, 表征两状态间的相似性; S_i^k 是网络中节点 k 的状态。被选取的初态 i 应该满足 $i = \text{argmax}(D_i)$ 。

轨迹熵法的基本思想是由初态确定的动力学轨迹应该在最大程度上降低网络的不确定性。从状态 i

出发共有 k 条不同的轨迹, 其中有 N_{ij} 个网络可产生第 j 条轨迹 Ξ_j , 则网络从状态 i 经过该轨迹 Ξ_j 的概率为 $p_{ij} = N_{ij} / \sum_{j=1}^k N_{ij}$ 。定义状态 i 的轨迹熵如式 (6)。

$$E_i = -\sum_j p_{ij} \cdot \log_2 p_{ij} \quad (6)$$

式中, 轨迹熵 E_i 表示由状态 i 出发演化的不确定性, 不确定性越大, 从该状态出发所包含的信息越多。理论上应该取轨迹熵最大的状态作为初态, 但由于可能网络的数目庞大, 很难用这种方法直接准确计算轨迹熵。因此, 通过引入转移概率 b_j 并假设其在演化中不变, 得到状态 i 在第 n 步轨迹熵 E_i^n 的估算迭代公式如式 (7)。

$$E_i^n = E_i^{n-1} + \sum_j b_j \cdot (E_j^{n-1} - E_j^{n-2}) \quad (n > 3) \quad (7)$$

利用式 (7) 计算得到 E_i^n 的收敛值即为从状态 i 出发的轨迹熵 E_i 。

随机采样法的基本假设是, 在可能网络库中随机抽取一定数量的网络, 如果该采样网络集的每条轨迹对应的网络数分布与整体网络的网络数分布相似, 则该采样网络集的最大轨迹熵应该与可能网络库的最大轨迹熵一致。因此, 在可能网络库中不断增加随机抽取的网络数量并计算该网络集的轨迹熵, 直到轨迹熵收敛为止。

通过提出最大路径距离、轨迹熵和随机采样三种初态选取的方法, 我们在三个已知生物调控系统 (芽殖酵母细胞周期网络、裂殖酵母细胞周期网络和大肠杆菌 SOS 通路) 中模拟计算并比较了计算复杂度、剩余可能网络数与试验步数的关系, 发现了随机采样法的综合表现最好, 最大路径距离法最差 (图8)^[54]。

对于可能网络库很大的这一问题, 虽然随机采样的方法在一定程度上缩小了网络拓扑空间, 但剩余网络数量依旧庞大, 需要进一步寻找新的优化策略。已有的研究表明最小网络是具有特定生物功能且调控边数最少的网络, 被认为是行使生物功能的骨架网络^[52]。这启发我们利用最小网络约束这一条件来进一步减少可能网络的数量。最小网络约束的思路是: 在随机采样的基础上, 先根据目标功能得到每个节点对应的析取范式形式来确定网络中一定存在的调控边, 然后对余下所有可能的网络进行穷举计算得到最小网络结构^[55]。例如, 在设计具有裂殖酵母细胞周期功能

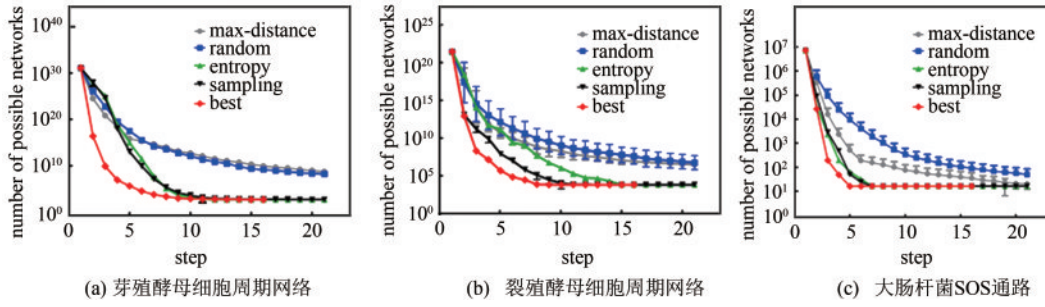


图 8 最大路径距离、轨迹熵和随机采样三种方法在三种生物网络中的表现^[54]

Fig. 8 The performances of the three methods in different biological pathways^[54]

的网络研究中，由动力学轨迹（表 1）可得到节点 Cdc2* 有逻辑表达式如式（8）。

$$\begin{aligned}
 & \overline{R_{Cdc25 - Cdc2^*}} \cdot \overline{R_{Slp1 - Cdc2^*}} \cdot \overline{R_{Cdc2 - Cdc2^*}} \cdot \\
 & \overline{G_{Wee1 - Cdc2^*}} \cdot \left(\overline{G_{Cdc2^* - Cdc2^*}} + R_{Wee1 - Cdc2^*} \right) \cdot \\
 & \left(\overline{G_{Rum1 - Cdc2^*}} + R_{Ste9 - Cdc2^*} + R_{Wee1 - Cdc2^*} \right) \cdot \\
 & \left(\overline{G_{Ste9 - Cdc2^*}} + R_{Rum1 - Cdc2^*} + R_{Wee1 - Cdc2^*} \right) \cdot \\
 & \left(G_{Cdc2 - Cdc2^*} + G_{Cdc2^* - Cdc2^*} + G_{Cdc25 - Cdc2^*} \right) \cdot \\
 & \left(\overline{G_{Cdc2 - Cdc2^*}} + R_{Wee1 - Cdc2^*} \right) \cdot \\
 & \left(\overline{G_{PP - Cdc2^*}} + R_{Ste9 - Cdc2^*} + R_{Rum1 - Cdc2^*} + R_{Wee1 - Cdc2^*} \right) \cdot \\
 & \left(\overline{G_{SK - Cdc2^*}} + R_{Ste9 - Cdc2^*} + R_{Rum1 - Cdc2^*} + R_{Wee1 - Cdc2^*} \right) \\
 & = \text{TRUE}
 \end{aligned} \tag{8}$$

根据式（8），可以确定具有目标功能的所有网络一定包含节点 Slp1 对节点 Cdc2* 的抑制调控 ($R_{Slp1 - Cdc2^*} = 1$)。表达式（8）的不确定项一共产生了 908 个可能网络，通过对这 908 个网络穷举计算，我们得到唯一最小网络，即 $R_{Slp1 - Cdc2^*} = 1$, $G_{Cdc25 - Cdc2^*} = 1$ ，其中节点 Cdc25 对节点 Cdc2* 的激活调控是由最小

网络约束得到的。在随机采样的基础上，我们用最小网络约束的逆向工程方法，通过对具有芽殖酵母细胞周期功能、大肠杆菌 SOS 功能和裂殖酵母细胞周期功能的网络进行模拟计算，在有限次计算步骤内筛选到了鲁棒性高且功能稳定的适量网络（图 9）^[55]。其中，在对具有芽殖酵母细胞周期功能的网络计算时，含有最小网络约束的逆向工程方法虽然在第一步计算后得到 10 884 个最小网络和 10 条最小网络公共边，但在第九步计算后就只剩下了一个最小网络 [图 9 (a)]，且该最小网络结构对应于真实的生物调控网络，证实了最小网络限制条件的合理性与有效性，进一步优化了逆向工程的过程。上述随机采样法和最小网络约束的两个理论是基于布尔网络的逆向工程指导合成生物学理性设计的雏形。

在以上基于布尔网络的逆向工程方法的设计中，我们并没有考虑网络的鲁棒性。因而在功能网络库中会存在大量鲁棒性不高的网络结构。为了提高网络设计的成功率，我们需要在基于布尔网络的逆向工程设计中加入生物网络鲁棒性的限制条件来筛选具有高鲁棒性的设计网络。非线性动力学认为

表 1 裂殖酵母细胞周期功能的动力学轨迹^[55]

Tab. 1 Biological pathway of fission yeast cell cycle network^[55]

Time	SK	Cdc2	Ste9	Rum1	Slp1	Cdc2*	Wee1	Cdc25	PP
1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3	0	1	0	0	0	0	1	0	0
4	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5	0	1	0	0	0	1	0	1	0
6	0	1	0	0	1	1	0	1	0
7	0	0	0	0	1	0	0	1	1
8	0	0	1	1	0	0	1	0	1
9	0	0	1	1	0	0	1	0	0

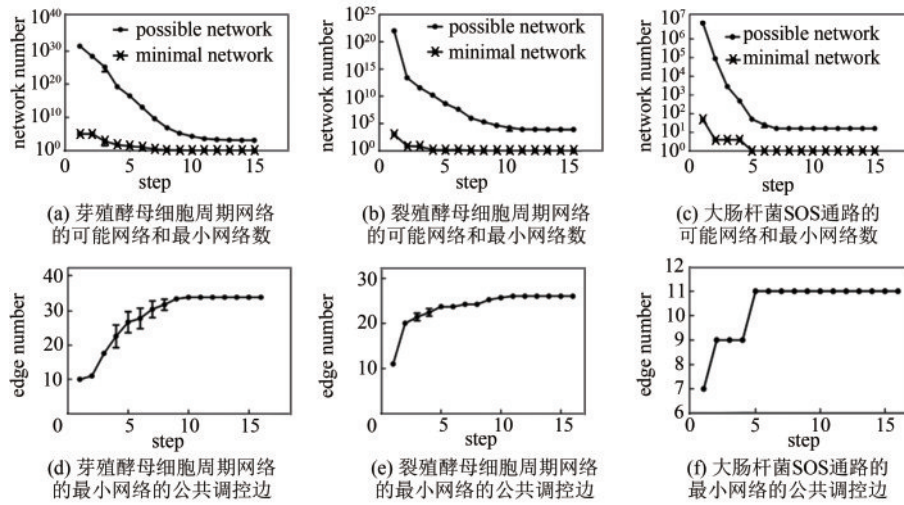


图9 随机采样法和最小网络约束在不同网络中的表现^[55]

Fig. 9 The performances of the two methods in different biological pathways^[55]

系统的鲁棒性是功能在系统状态受外部扰动时的动力学稳定性和功能在系统参数受扰动时的结构稳定性。目前常见的生物网络动力学稳定性限制包括衡量生物网络全局状态稳定性的吸引盆大小和表征网络动力学演化轨迹全局吸引性的一维中心流形。除了上述两种生物网络动力学稳定性的限制条件外，我们又提出了网络调控熵的概念，从网络拓扑结构的角度对生物网络鲁棒性提出了新的限制。普遍认为调控网络的动力学行为主要由拓扑结构的性质决定。因此，生物调控网络的鲁棒性应该源于拓扑结构中调控边的特殊分配。我们从调控网络的结构特征出发，提出了衡量网络拓扑结构与鲁棒性关系的调控熵^[56]。网络拓扑结构是调控网络基于图论的命名，由若干节点和连接这些节点的所有通路构成。通过定义路径为拓扑结构中从节点*i*出发到节点*j*的任意有向通路，我们得到了从节点*i*指向节点*j*的所有路径集合 $\mathbb{P}(i \rightarrow j)$ 。定义节点*i*对节点*j*的调控熵 S_{ij} 如式(9)。

$$S_{ij} = -p_{ij} \log_2 p_{ij} - (1 - p_{ij}) \log_2 (1 - p_{ij}) \quad (9)$$

式中， p_{ij} 是 $\mathbb{P}(i \rightarrow j)$ 中从节点*i*指向节点*j*的激活路径数占总路径数的比例。当 $\mathbb{P}(i \rightarrow j)$ 中没有激活路径或均为激活路径时， p_{ij} 趋向于0或1，对应的调控熵 S_{ij} 取最小值0，当 $p_{ij}=1/2$ 时，调控熵 S_{ij} 取最大值1。通过进一步定义节点的调控熵 S_i 为所有指向节点*j*的调控熵 S_{ij} 的均值，那么网络的调控熵 S 是网络中各节点的调控熵 S_i 的均值。例如，在图10所示的

调控网络中，各节点的调控熵与该调控网络的调控熵 S 如式(10)~式(13)。

$$S_A = \frac{(S_{AA} + S_{BA} + S_{CA})}{3} = 0 \quad (10)$$

$$\begin{aligned} S_B &= \frac{(S_{AB} + S_{BB} + S_{CB})}{3} \\ &= \frac{1}{3} \left[0 + \left(-\frac{2}{3} \log_2 \frac{2}{3} - \frac{1}{3} \log_2 \frac{1}{3} \right) + 1 \right] \\ &\approx 0.639 \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} S_C &= \frac{(S_{AC} + S_{BC} + S_{CC})}{3} \\ &= \frac{1}{3} \left[0 + 0 + \left(-\frac{1}{3} \log_2 \frac{1}{3} - \frac{2}{3} \log_2 \frac{2}{3} \right) \right] \\ &\approx 0.306 \end{aligned} \quad (12)$$

$$S = \frac{(S_A + S_B + S_C)}{3} \approx 0.315 \quad (13)$$

调控熵作为序参量，用于描述网络调控关系整体耦合的非一致性。显然，网络的调控关系越一致，网络的调控熵越小。

通过对具有芽殖酵母细胞周期和裂殖酵母细胞周期功能的生物网络与相同调控边的随机网络的研究，我们发现了生物网络的调控熵远低于绝大部分随机网络的调控熵。此外，通过对网络动力学稳定性和结构稳定性的研究，我们发现了网络的调控熵越低，对应的吸引盆越大(图11)，且 Q 值越高(图12)，即网络的调控熵越低鲁棒性越

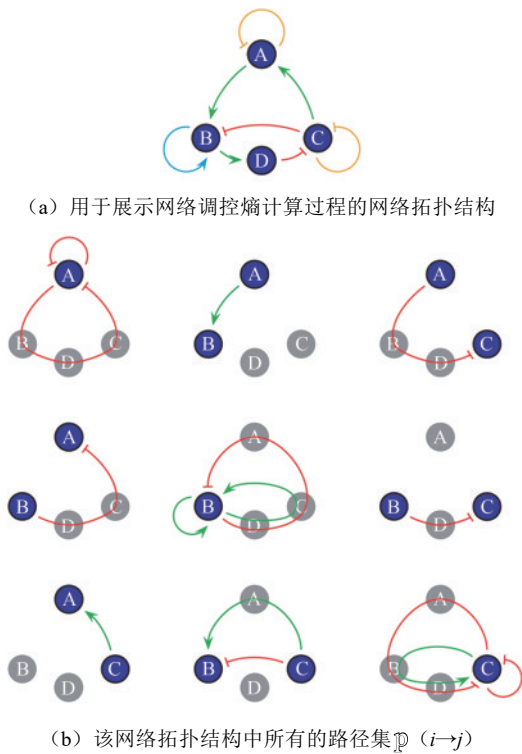
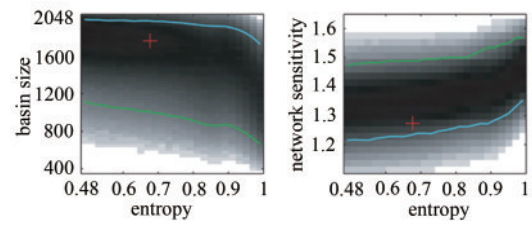


图 10 网络的调控熵的计算示例^[56]

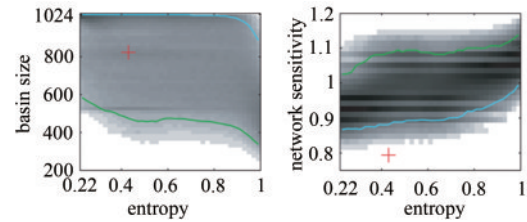
Fig. 10 Illustration of calculating the regulation entropy^[56]

高。为了验证该理论的普遍性，在四个网络尺度更大的调控网络中的计算结果进一步验证了调控熵与鲁棒性的负相关关系。通过引入调控熵这一序参量，建立了网络拓扑结构与鲁棒性之间的联系，即网络的调控关系越一致，调控熵越低，对应的网络鲁棒性越高。因此，在具有复杂功能的网络结构设计中，调控熵的引入将极大地提高调控网络的鲁棒性，进一步降低复杂网络设计的难度。

基于上述工作，通过分析系统生物学已有的研究方法，我们又提出了结合布尔网络与连续模型各自优势的指导理性设计的新思路（图 13）^[57]：首先，在最小网络约束的限制下用基于布尔网络的逆向工程方法筛选出具有目标功能的可能网络库，然后利用连续模型对其中的每个可能网络进行详细的动力学研究与性能评价（图 14）^[58]。例如，在对具有 SOS 响应功能的网络结构探索中，首先在随机采样和最小网络约束的基础上，用基于布尔网络的逆向工程方法得到了 48 个最小网络与 7.1×10^6 个可能的网络，再用微分方程模型对所有备选网络进行动力学模拟。与网络穷举类似，对每个备选网络进行动力学模拟计算时，用 Q 值



(a) 芽殖酵母细胞周期网络的动力学稳定性与调控熵的关系

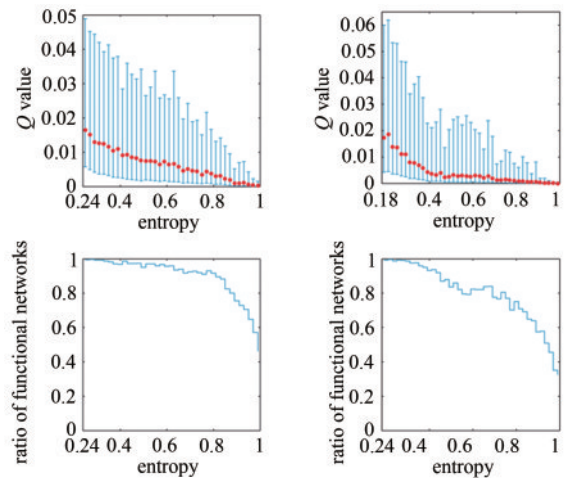


(b) 裂殖酵母细胞周期网络的动力学稳定性与调控熵的关系

图 11 网络调控熵与动力学稳定性的关系^[56]

Fig. 11 The relationship of network regulation entropy and dynamic stability^[56]

（蓝色和绿色线分别表示稳定性最高的前 5% 和后 5% 的随机网络对应的动力学稳定性，红十字表示相应的生物网络的动力学稳定性和调控熵）



(a) 芽殖酵母细胞周期网络的结构稳定性与调控熵的关系 (b) 裂殖酵母细胞周期网络的结构稳定性与调控熵的关系

图 12 网络调控熵与结构稳定性的关系^[56]

Fig. 12 The relationship of network regulation entropy and structural stability^[56]

（红色点表示具有相同调控熵的随机网络鲁棒性的均值）

和吸引盆大小这两个指标来定量刻画网络结构的鲁棒性。从离散模型过渡到连续模型时，布尔网络的粗粒化会使时间尺度与离散阈值的选取不唯一，进而导致离散模型下的一条轨迹对应连续模

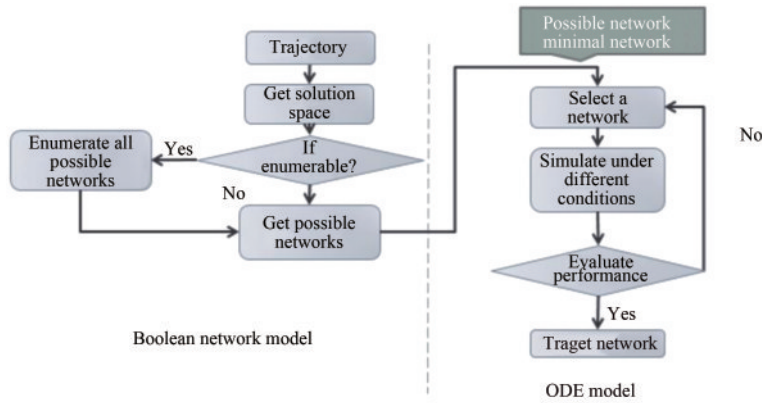


图 13 从布尔网络模型到连续模型的生物回路设计流程图^[57]

Fig. 13 The workflow of the design from Boolean network model to continuous model^[57]

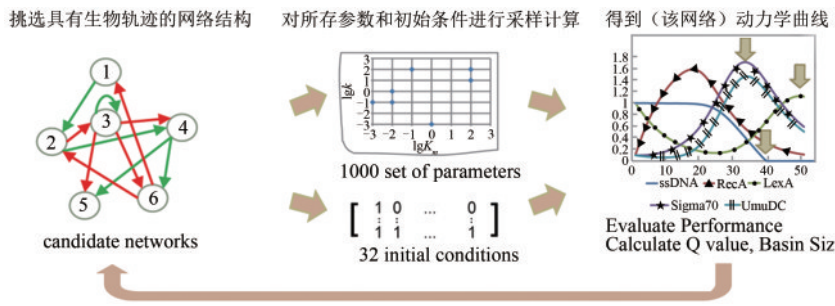


图 14 连续模型的定量刻画与评价流程^[58]

Fig. 14 The workflow of continuous model^[58]

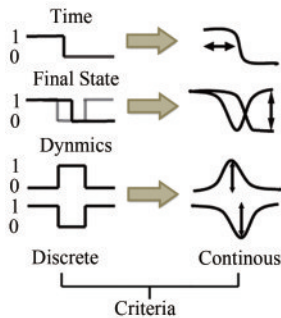


图 15 在布尔网络模型和连续模型下的三个限制条件^[58]

Fig. 15 The three criteria in the Boolean network model and continuous model^[58]

[第一个限制条件是 ssDNA 的浓度在结束计算时应下调；第二个是系统在经过响应反应后应回到初态 (ssDNA 除外)；第三个是节点在两种模型下的动力学行为特征应该保持一致]

型下的不同时序轨迹。为了解决这个问题，我们提出了在离散模型和连续模型下的具体限制条件（图 15）。通过连续模型对所有最小网络的精细刻画，发现了由离散模型筛选的最小网络均能实现目标功能且普遍具有较高鲁棒性，说明第一步的离散模型帮助我们剔除了大量无关网络，减小了连续

模型的计算量，避免了计算的浪费。此外，对芽殖酵母细胞周期功能的研究结果也证明了我们这种方法指导理性设计的合理性与有效性。这种从离散模型到连续模型的方法不仅可以找到具有特定功能且鲁棒性高的网络结构，还可以帮助我们理解生物网络的功能设计原理。

3 总结

合成生物学在自下而上的正向工程指导下取得了一定的成功，然而，通过这种思路得到的设计原理是单一的、没有系统性的，而且这种设计思路忽视的问题在复杂系统的理性设计与实验实现中变成了主要问题。在系统生物学的帮助下，逆向工程指导合成生物学理性设计的方法，既能获得具有复杂功能的生物网络，又能降低回路设计的难度。目前关于逆向工程指导合成生物学理性设计的工作，如网络穷举、子网络合并、基于布尔网络的逆向工程、从离散模型到连续模型的

方法等, 均表明这种方法的可行性与有效性, 为后续的研究提供了有价值的信息。但是, 目前用逆向工程指导合成生物学实验的研究工作依旧太少, 两者的结合程度还达不到实际的要求程度, 需要更多的实验实例验证。造成这一现象的主要原因是精准组装具有复杂调控功能的基因线路的困难。精准组装指的是用元件独自表征时的动力学参数就足够预测元件组装后的基因线路功能与性能。目前精准组装调控线路是一个极具挑战性的工作, 即使构建简单的基因线路也需要耗费大量的时间。而基因线路精准组装的困难主要来自于: 生物系统的元器件存在突变、进化等各种遗传稳定性问题、生物元器件组装后在宿主细胞中的相互作用对目标功能的影响、构建的外源复杂基因回路与宿主细胞的相互影响等问题^[59]。虽然在精准组装方面已有初步研究进展^[49, 59-60], 但是目前精准组装基因线路的难度依旧很大, 有待我们进一步研究, 从而更加方便地构建具有复杂功能的调控回路。我们相信, 在突破逆向工程在合成生物学中实际应用的瓶颈后, 在逆向工程的指导下, 合成生物学的理性设计很快可以投入到具体的应用生产中。

参 考 文 献

- [1] IDEKER T, THORSSON V, RANISH J A, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network[J]. *Science*, 2001, 292(5518): 929-934.
- [2] BARABÁSI A, CRANDALL R E. Linked: the new science of networks[J]. *American Journal of Physics*, 2002, 71(4): 243-270.
- [3] WOLKENHAUER O. Systems biology: the reincarnation of systems theory applied in biology?[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2001, 2(3): 258-270.
- [4] BORNHOLDT S. Less is more in modeling large genetic networks[J]. *Science*, 2005, 310(5747): 449-451.
- [5] FRIEDMAN N. Inferring cellular networks using probabilistic graphical models[J]. *Science*, 2004, 303(5659): 799-805.
- [6] SAEZ-RODRIGUEZ J, ALEXOPOULOS L G, EPPERLEIN J, et al. Discrete logic modelling as a means to link protein signaling networks with functional analysis of mammalian signal transduction[J]. *Molecular Systems Biology*, 2009, 5(1): e331.
- [7] BASSO K, MARGOLIN A A, STOLOVITZKY G, et al. Reverse engineering of regulatory networks in human B cells[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(4): 382-390.
- [8] ZOPPOLI P, MORGANELLA S, CECCARELLI M. TimeDelay-ARACNE: reverse engineering of gene networks from time-course data by an information theoretic approach[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(1): 154-169.
- [9] YEUNG M K S, TEGNÉR J, COLLINS J J. Reverse engineering gene networks using singular value decomposition and robust regression[J]. *PNAS*, 2002, 99(9): 6163-6168.
- [10] TEGNER J, YEUNG M K S, HASTY J, et al. Reverse engineering gene networks: integrating genetic perturbations with dynamical modeling[J]. *PNAS*, 2003, 100(10): 5944-5949.
- [11] BONGARD J, LIPSON H. Automated reverse engineering of nonlinear dynamical systems[J]. *PNAS*, 2007, 104(24): 9943-9948.
- [12] D'HAESELEER P, LIANG S, SOMOGYI R. Genetic network inference: from co-expression clustering to reverse engineering [J]. *Bioinformatics*, 2000, 16(8): 707-726.
- [13] GARDNER T S, FAITH J J. Reverse-engineering transcription control networks [J]. *Physics of Life Reviews*, 2005, 2(1): 65-88.
- [14] VILLAVERDE A F, BANGA J R. Reverse engineering and identification in systems biology: strategies, perspectives and challenges [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2014, 11(91): 20130505.
- [15] SLUSARCZYK A L, LIN A, WEISS R. Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(6): 406-420.
- [16] CANTON B, LABNO A, ENDY D. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(7): 787-793.
- [17] ENDY D. Foundations for engineering biology[J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 449-453.
- [18] ELOWITZ M B, LEIBLER S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 335-338.
- [19] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-342.
- [20] BASHOR C J, HORWITZ A A, PEISAJOVICH S G, et al. Rewiring cells: synthetic biology as a tool to interrogate the organizational principles of living systems[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2010, 39: 515-537.
- [21] MAYO A E, SETTY Y, SHAVIT S, et al. Plasticity of the cis-regulatory input function of a gene[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(4): 555-561.
- [22] ANDERSON J C, VOIGT C A, ARKIN A P. Environmental signal integration by a modular AND gate[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3(1): e133.
- [23] TAMSIR A, TABOR J J, VOIGT C A. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires' [J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 212-215.
- [24] MOON T S, LOU C, TAMSIR A, et al. Genetic programs con-

- structed from layered logic gates in single cells[J]. *Nature*, 2012, 491(7423): 249-253.
- [25] LOU C, LIU X, NI M, et al. Synthesizing a novel genetic sequential logic circuit: a push-on push-off switch[J]. *Molecular Systems Biology*, 2010, 6(1): e350.
- [26] WANG B, KITNEY R I, JOLY N, et al. Engineering modular and orthogonal genetic logic gates for robust digital-like synthetic biology[J]. *Nature Communications*, 2011, 2(1): 1-9.
- [27] BALAGADDÉ F K, SONG H, OZAKI J, et al. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem[J]. *Molecular Systems Biology*, 2008, 4(1): e187.
- [28] MARTIN V J J, PITERA D J, WITHERS S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 796-802.
- [29] RO D K, PARADISE E M, OUELLET M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [30] ZHANG H, LIN M, SHI H, et al. Programming a Pavlovian-like conditioning circuit in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 1-10.
- [31] MATSUURA S, ONO H, KAWASAKI S, et al. Synthetic RNA-based logic computation in mammalian cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1-8.
- [32] LIU W, CREMER J, LI D, et al. An evolutionarily stable strategy to colonize spatially extended habitats[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 664-668.
- [33] BASHOR C J, PATEL N, CHOUBEY S, et al. Complex signal processing in synthetic gene circuits using cooperative regulatory assemblies[J]. *Science*, 2019, 364(6440): 593-597.
- [34] SHAO Y, LU N, WU Z, et al. Creating a functional single-chromosome yeast[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 331-335.
- [35] MCKAY M D, BECKMAN R J, Conover W J. A comparison of three methods for selecting values of input variables in the analysis of output from a computer code[J]. *Technometrics*, 2000, 42(1): 55-61.
- [36] MA W, TRUSINA A, EI-SAMAD H, et al. Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 760-773.
- [37] MA W, LAI L, OUYANG Q, et al. Robustness and modular design of the *Drosophila* segment polarity network[J]. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2(1): e70.
- [38] YAN L, OUYANG Q, WANG H. Dose-response aligned circuits in signaling systems[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34727.
- [39] CHAU A H, WALTER J M, GERARDIN J, et al. Designing synthetic regulatory networks capable of self-organizing cell polarization[J]. *Cell*, 2012, 151(2): 320-332.
- [40] ZHENG M M, SHAO B, OUYANG Q. Identifying network topologies that can generate turing pattern[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2016, 408: 88-96.
- [41] WU L, OUYANG Q, WANG H. Robust network topologies for generating oscillations with temperature-independent periods[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171263.
- [42] GERARDIN J, REDDY N R, LIM W A. The design principles of biochemical timers: circuits that discriminate between transient and sustained stimulation[J]. *Cell Systems*, 2019, 9(3): 297-308.
- [43] GUET C C, ELOWITZ M B, HSING W, et al. Combinatorial synthesis of genetic networks[J]. *Science*, 2002, 296(5572): 1466-1470.
- [44] MANGAN S, ALON U. Structure and function of the feed-forward loop network motif[J]. *PNAS*, 2003, 100(21): 11980-11985.
- [45] WHITAKER W R, DAVIS S A, ARKIN A P, et al. Engineering robust control of two-component system phosphotransfer using modular scaffolds[J]. *PNAS*, 2012, 109(4): 18090-18095.
- [46] 习静怡. 生物网络逆向工程的子网络合并法以及生物系统中的量子热力学[D]. 北京: 北京大学, 2017.
- XI J Y. Sub-network combination in biological network reverse engineering and quantum thermodynamics in biological systems [D]. Beijing: Peking University, 2017.
- [47] XI J Y, OUYANG Q. Using sub-network combinations to scale up an enumeration method for determining the network structures of biological functions[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168214.
- [48] WU L, WANG H, OUYANG Q. Constructing network topologies for multiple signal-encoding functions[J]. *BMC Systems Biology*, 2019, 13(1): 6.
- [49] ZENG W, DU P, LOU Q, et al. Rational design of an ultrasensitive quorum-sensing switch[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(8): 1445-1452.
- [50] 曾维倩. 基于逆向工程的超敏细胞密度开关的理性设计[D]. 北京: 北京大学, 2017.
- ZENG W Q. Rational design of an ultrasensitive cell density switch based on reverse engineering[D]. Beijing: Peking University, 2017.
- [51] LI F, LONG T, LU Y, et al. The yeast cell-cycle network is robustly designed[J]. *PNAS*, 2004, 101(14): 4781-4786.
- [52] WANG G, DU C, CHEN H, et al. Process-based network decomposition reveals backbone motif structure[J]. *PNAS*, 2010, 107(23): 10478-10483.
- [53] 张晓萌. 布尔网络动力学研究及其反向工程[D]. 北京: 北京大学, 2011.
- ZHANG X M. Dynamics and reverse engineering of Boolean network[D]. Beijing: Peking University, 2011.
- [54] ZHANG X, SHAO B, WU Y, et al. A reverse engineering approach to optimize experiments for the construction of biological regulatory networks[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75931.
- [55] SHAO B, WU J, TIAN B, et al. Minimum network constraint on

reverse engineering to develop biological regulatory networks [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2015, 380: 9-15.

- [56] WU Y, ZHANG X, YU J, et al. Identification of a topological characteristic responsible for the biological robustness of regulatory networks[J]. *PLoS Computational Biology*, 2009, 5(7): e1000442.

- [57] 邵斌. 生物网络逆向工程及其应用[D]. 北京: 北京大学, 2016.

SHAO B. Biological network reverse engineering and its applications[D]. Beijing: Peking University, 2016.

- [58] SHAO B, LIU X, ZHANG D, et al. From Boolean network model to continuous model helps in design of functional circuits[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0128630.

- [59] 张浩千. 细菌转录调控线路的精准制造[D]. 北京: 北京大学, 2016.

ZHANG H Q. High-precision manufacturing of transcriptional regulatory circuits in bacteria [D]. Beijing: Peking University, 2016.

- [60] ZONG Y Q, ZHANG H M, LYU C, et al. Insulated transcriptional elements enable precise design of genetic circuits[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1-13.



通讯作者: 欧阳颀(1955—),男,博士,教授,中国科学院院士,研究方向为定量系统生物学、生物网络动力学、生物系统中的非线性问题、生物微流体技术。

E-mail: qi@pku.edu.cn



第一作者: 陈欣懋(1994—),女,博士研究生,研究方向为定量系统生物学和合成生物学。

E-mail: xmaochen@pku.edu.cn