

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

用系統工程方法設計強健生物 IC 電路--子計畫三：以定向 演化達成合成途徑最佳化與驗證強健系統設計理論 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：整合型

計畫編號：NSC 98-2221-E-009-182-

執行期間：98年08月01日至99年07月31日

執行單位：國立交通大學生物科技學系(所)

計畫主持人：李曉青

共同主持人：曾慶平

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 99 年 11 月 02 日

【前言】

合成生物學(synthetic biology)是現代生物學的新興研究領域，其利用基因重組技術製造各種生物元件，組合成生物 IC 電路(biological IC circuit)，讓其依循可預期的方式表現出特定功能，控制細胞進行一系列的工作。合成生物學將機電領域之系統設計理論應用到生物系統，開拓基因重組生物與工程的交集，產生真正可由程式控制的生物。傳統遺傳工程學可在細菌或生物中嵌入少數基因，使生物體內目標蛋白質大量表現。但是新興的合成生物學中的生物基因電路設計則以更廣泛的規模重新設計生物體內生合成途徑，外加的將不是單一基因，而是要改變過去的單基因移轉技術，將基因群組裝為生物 IC 電路轉移至宿主細胞，使其表現出全新的基因調控網路(gene regulatory network)。2000 年後，麻省理工學院、普林斯頓大學及柏克萊大學等知名研究單位，建構出生物 IC 因電路，包括振盪器[1]、扳鍵開關基因電路[2]、自動抑制基因電路[3]、生物距離感應器[4]、生物底片[5] 及生物計數器[6]。等。這些生物電路雖然只是模擬工程中簡單電路，卻已經受到科學界高度重視，先後發表於 *Nature*、*Science* 等頂尖期刊。顯見在 21 世紀，生物基因電路設計用於合成生物學，將會像現代的電子電機技術一樣迅速發展，用以改造細胞，設計經濟效益最佳的產物生產途徑，在製藥、化合物、生質能源等領域應用廣泛、潛力無窮。[7]。

經過基因改造的微生物只需要做一些生化合成途徑修改，就可以製造出一些藥物或能源的化合物。例如以多個基因轉殖於大腸桿菌，組合成藥物合成路徑，使其合成抗瘧疾藥物青蒿素(artemisinin)的研究是生物基因電路的重要成就之一。由苦艾草純化的青蒿素能有效對抗瘧疾，但是由於含量太稀少，使得萃取成本很高。雖然現有生物技術可以將相關的代謝途徑移轉到大腸桿菌上，但是要達到經濟效益，其產量需要有 7 個數量級的提升。為克服此瓶頸，美國 Keasling 教授的研究團隊對代謝途徑作了重新設計，在大腸桿菌中插入 10 個基因合成 amorphaadiene，即青蒿素的前趨物[8]。被插入的基因群可以將生物體內常見的 acetyl-CoA 轉變成 amorphaadiene，但是許多合成過程中的中間產物，包括 isopentenyl pyrophosphate (IPP)，在高濃度時會對菌體產生致命毒性。因此，實驗成功的關鍵在於平衡細菌體內合成 amorphaadiene 的多步反應，協調合成相關基因以平衡 IPP 的合成與利用，確保 IPP 在傷害大腸桿菌前及時轉化為

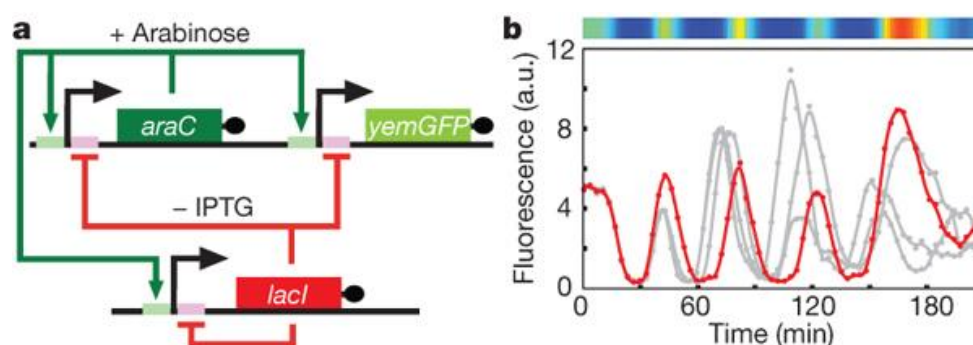
amorphadiene。傳統基因工程都是將基因組裝於過量表現之啟動子之後，使生合成途徑所需蛋白質過量表現，但是過量表現外來蛋白質會消耗菌體本身有限生長資源，而且中間產物可能過量累積造成生物毒性，使細菌生長減緩，無法達到產量最佳化。本計畫中將引進生物 IC 電路設計概念，通過生物基因電路設計精細調整合成途徑中表現蛋白質的平衡，計算出外來蛋白質群表現與菌體生長速率的最佳平衡點，藉以控制生合成途徑，使產物達到最佳化產量。

現在生物 IC 電路用於製藥領域或是生質能源無法普及的最重要原因是化合物的產量無法提升，使生合成產物單位生產成本過高，無法產生經濟效益。分解生物廢棄物(如稻殼、麥桿，木材廢料等)產生植物纖維乙醇，生質柴油，生質丁醇等多樣化生質能源是替代能源新趨勢。在微生物生產酒精、丁醇及長鏈醇類的過程中，糖類利用速率決定產物生成速率，因此提高糖解作用速率是增加酒精產率的重要關鍵。在酵母菌厭氧發酵產酒精路徑中，利用遺傳工程外加參與糖解作用中的基因群於酵母菌中，無論是單獨表現一個或是同時過量表現多個基因群，對最後酒精產量並沒有明顯影響，顯示利用外加載體過量表現糖解蛋白並不能再增加糖解途徑的流量[9-10]。這些例子均說明在宿主細胞中，建立生物 IC 電路架構合成途徑表現外來生合成途徑時，常會有一些非期望中的改變發生。像是過量表現外來基因佔用過多細胞資源，使生物生長速率減緩；或是有些酵素活性或表現量過低，引起代謝中間產物堆積，造成生合成途徑不平衡或是產生細胞毒性等等，這些都會使培養基到產物的效率無法最佳化[9]。為解決上述困難，需要調整外加於宿主細胞中的生物 IC 電路基因群間的平衡，使每一步驟的中間產物都能充分被下一步驟酵素使用，減少中間產物對宿主的生物毒性，並降低中間產物對酵素的負迴饋抑制，使合成途徑在細胞穩定表現，達到最終產物產量最佳化的目標。這些目的都需要考慮進行基因轉殖時送入宿主細胞的生物 IC 電路結構，及各基因間的表現量控制。因此雜訊過濾、系統強健性設計、訊號與系統控制等在電子電機領域已經是高度發展的理論，非常迫切需要引用到生物 IC 電路設計，帶領其朝向更複雜多工的跨領域發展。

【研究目的】

合成生物學是現代生物學的新興研究領域，其利用基因重組技術製造各種生物元件，組合成生物 IC 電路，讓其依循可預期的方式表現出特定功能，控制細

胞進行一系列的工作。合成生物學將機電領域之系統設計理論應用到生物系統，開拓基因重組生物與工程的交集，產生真正可由程式控制的生物。2004 年合成生物學被美國麻省理工學院出版的 Technology Review 評為“將改變世界的十大新技術之一”。



圖一：雙回饋控制設計的生物 IC 振盪器電路。a:基因電路架構圖。利用組合啟動子(Plac/ara-1)控制 *araC* 及 *lacI* 基因表現，構築出生物 IC 振盪器電路中的正回饋及負回饋迴路。b:加入 IPTG 及 arabinose 誘發物後，紅線顯示出單一細胞的螢光表現量。顯示出生物電路正在進行週期大約 13 分鐘的振盪行為。[11]

然而現今生物 IC 電路面臨的難題是在生物體中，加入生物 IC 電路表現外加基因群修改合成途徑，並不一定能使最終產物產量增加，常會有一些非期望中的改變發生。像是：一、過量表現前趨物到最終產物間的酵素群，會佔用細胞內資源，造成宿主細胞生長負擔，減緩細胞本身的生長速率。二、某些外加於合成途徑中的中間產物或最終產物有生物毒性，在生合成過程中累積於宿主細胞中，會造成細胞生長遲緩或死亡。三、在代謝途徑中存在負回饋控制，中間產物會抑制合成途徑中酵素活性，使合成途徑流量無法持續增加[9]。四、生物電路在細胞內表現短暫功能後會逐漸崩潰，無法穩定運作於細胞中，喪失實用價值。基因表達時的雜訊，不同 RNA 剪裁、DNA 突變及熱擾動等造成內在生化參數變動，以及細胞環境變遷與其他基因交互作用所造成的干擾，都會使人工製造出來的基因電路無法穩定運作。而且當基因電路的複雜性增高，干擾會逐漸累加，嚴重影響基因電路的運作。這也是現今目前發表的生物 IC 電路很難朝複雜化極多功能化發展的重要原因[1-2, 4, 12]。圖一表示出加入雙回饋控制設計，使生物 IC 振盪器電路穩定性增加的新設計[11]。Hasty 教授的研究團隊將 2000 年發表於 Nature 期

刊的振盪器迴路中加入回饋控制[1]，使其穩定性及同步性增加，結果再度發表於 Nature 期刊。圖一 b 顯示宿主細胞會有週期約 13 分鐘的閃爍螢光，但是不同細胞或週期下，螢光表現量的震幅仍未能完全同步，而且在振盪次數增加後，細胞的螢光不同步化會逐漸明顯，使振盪器電路趨向崩潰。顯見增加生物 IC 電路的強健性，使其能克服各種外加或內在干擾，穩定表現變成出設計的功能是合成生物學亟待解決的重要課題。

整合型計畫總主持人陳博現教授已經發表多篇論文增加生物 IC 電路穩健性的理論[13-19]。不過設計出來的生物 IC 電路如果要實際於生物體內表現，需要瞭解生物電路在生物體中的運作情形並予以量化，例如 mRNA 和蛋白質的生成速率、降解速率及穩定性，蛋白質和 DNA 交互作用的強度，細胞內在或外在的雜訊分布情形等參數提供都是不可或缺的重要因素。但是在整合型計畫進行初期，這些參數無法全數取得，使得實現生物 IC 電路藍圖遭遇阻礙。為克服此難題，本子計畫利用定向演化先進行人造基因電路 RBS (ribosome-binding site) 序列突變改造，先篩選出不同調控強度的生物電路組合，將系統的輸入(DNA 序列，誘發物濃度)及輸出(螢光表現強度)回傳給其他子計畫，讓合作子計畫估測基因電路的生物參數數值，並建立系統動態方程組。其他子計畫並將利用此本子計畫實驗資料調整模擬電路與實際生物電路的參數差異性，使架構的生物電路更符合實際生物體內行為。此子計畫中並設計一個具有交互作用的生物 IC 電路來探討並驗證系統強建設計理論。

【參考文獻】

- [1] M. B. Elowitz and S. Leibler, "A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators," *Nature*, vol. 403, pp. 335-8, Jan 20 2000.
- [2] T. S. Gardner, *et al.*, "Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*," *Nature*, vol. 403, pp. 339-42, Jan 20 2000.
- [3] A. Becskei and L. Serrano, "Engineering stability in gene networks by autoregulation," *Nature*, vol. 405, pp. 590-3, Jun 1 2000.
- [4] S. Basu, *et al.*, "A synthetic multicellular system for programmed pattern formation," *Nature*, vol. 434, pp. 1130-4, Apr 28 2005.
- [5] A. Levskaya, *et al.*, "Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light," *Nature*, vol. 438, pp. 441-2, Nov 24 2005.
- [6] A. E. Friedland, *et al.*, "Synthetic gene networks that count," *Science*, vol. 324, pp. 1199-202, May 29 2009.

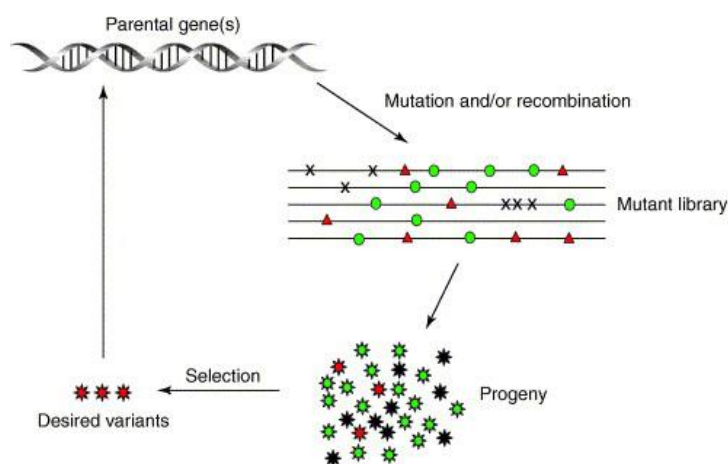
- [7] S. A. Benner and A. M. Sismour, "Synthetic biology," *Nat Rev Genet*, vol. 6, pp. 533-543, 2005.
- [8] V. J. Martin, *et al.*, "Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids," *Nat Biotechnol*, vol. 21, pp. 796-802, Jul 2003.
- [9] J. Hauf, *et al.*, "Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Enzyme Microb Technol*, vol. 26, pp. 688-698, Jun 1 2000.
- [10] H. Peter Smits, *et al.*, "Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 16, pp. 1325-34, Oct 2000.
- [11] J. Stricker, *et al.*, "A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator," *Nature*, vol. 456, pp. 516-9, Nov 27 2008.
- [12] B. Canton, *et al.*, "Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices," *Nat Biotechnol*, vol. 26, pp. 787-93, Jul 2008.
- [13] B. S. Chen and C. H. Wu, "A systematic design method for robust synthetic biology to satisfy design specification," *BMC Syst Biol*, 2009.
- [14] B. S. Chen, *et al.*, "Robust H_{∞} stabilization design in gene networks under stochastic molecular noises: fuzzy-interpolation approach," *Special Issue on Systems Biology, IEEE Transactions on System, Man and Cybernetics Part B: Cybernetics* vol. 38, pp. 25-42, Feb 2008.
- [15] B. S. Chen and P. W. Chen, "Robust Engineered Circuit Design Principles for Stochastic Biochemical Networks With Parameter Uncertainties and Disturbances," *Biomedical Circuits and Systems, IEEE Transactions on*, vol. 2, pp. 114-132, 2008.
- [16] B. S. Chen and W. S. Wu, "Robust Filtering Circuit Design for Gene Networks under Intrinsic and Extrinsic Molecular Noises," in *Systems, Man and Cybernetics, 2006. SMC '06. IEEE International Conference on*, 2006, pp. 3590-3595.
- [17] B. S. Chen and W. S. Wu, "Robust filtering circuit design for stochastic gene networks under intrinsic and extrinsic molecular noises," *Mathematical Biosciences* vol. 211, pp. 342-55, Feb 2008.
- [18] B. S. Chen, *et al.*, "On the robust circuit design schemes of biochemical networks: steady-state approach," *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, vol. 1, pp. 91-104, 2007.
- [19] B.-S. Chen, *et al.*, "Robust synthetic biology design: stochastic game theory approach," *Bioinformatics*, May 19 2009.

【研究方法】

單純的電機元件轉成生物元件後，就有許多生物參數需要控制。但在生物中有許多行為尚未完全被瞭解，例如不同的啟動子 DNA 序列到底會對應多少強度

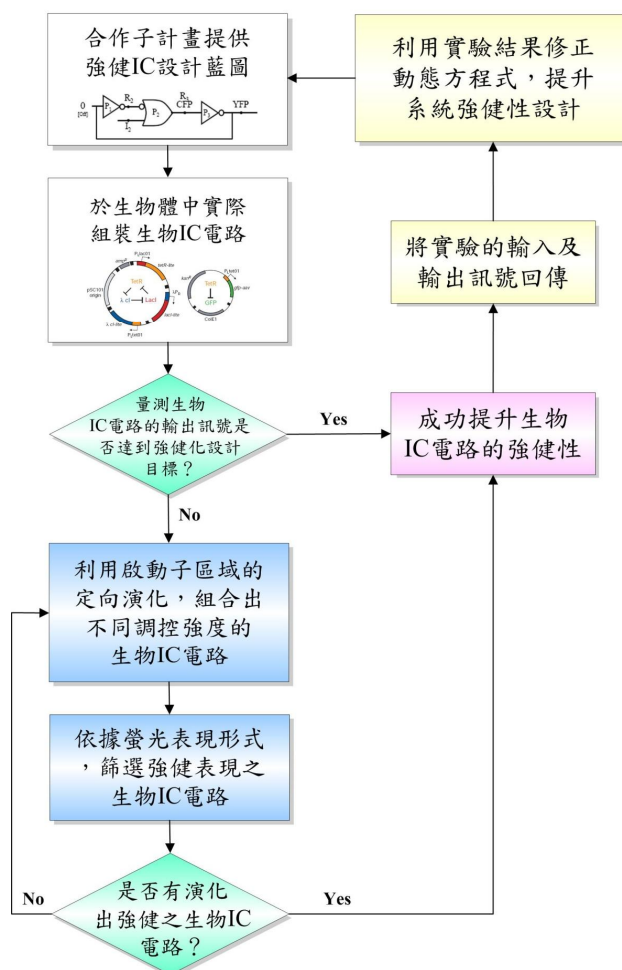
的 mRNA 或蛋白質表現，這是很難事先預測的。除非針對特定的啟動子 DNA 序列實際設計實驗去偵測下游基因表現強度，不然生物學家只能告知啟動子強或弱的大概區間。在生物 IC 電路設計流程中，如果要開出強健性電路設計規格，就會規定每一個基因的表現強度一定要在哪些範圍。生物學家拿到此設計藍圖，因為生物元件庫組合還不夠多，往往無法由生物元件庫中取得所需元件，只能先組裝出最接近設計藍圖的生物 IC 電路。這種大概組裝出來的生物 IC 電路不見得可以在宿主細胞中穩定運作，這也是現今已發表的生物電路無法穩定表現的原因之一。

為克服上述生物元件庫可調控元件不足的困難，本子計畫引入定向演化技術(圖二)，改良生物 IC 電路組裝無法逼近設計藍圖的問題。定向演化概念是利用分生技術在 DNA 序列產生些許改變，模擬自然界的突變作用，使子代的變異性增加，之後在突變子代中選取想要特性(Chatterjee and Yuan, 2006; Yokobayashi, et al., 2002)。本計畫將在啟動子區域做定向演化，將利用 error-prone PCR 技術、DNA shuffling 或是 random point mutagenesis 等分生技術在核糖體結合區域(ribosome binding site: RBS)的 DNA 序列做一些點突變，這可以使 RBS 轉譯強度發生強化弱的些微變化。我們再由各種不同調控強度組合的生物 IC 電路中，選取最接近設計藍圖的子代。於篩選出的子代中繼續做定向演化，可以逐漸逼近設計藍圖。



圖二：定向演化示意圖。先在親代 DNA 序列中造成突變，產生含有不同突變序列的子代組合。在由突變的子代組合中篩選出想要的基因表現特性。於篩選出的子代中繼續做定向演化，可以逐漸逼近想要的表現行為。

建立 DNA 元件庫後，本子計畫將依據合作子計畫所提供的強健 IC 設計藍圖，於今年已經建立的生物 IC 元件庫中挑選元件，實際組裝生物 IC 電路送到宿主細胞。量測生物電路螢光蛋白輸出訊號，回傳給合作子計畫，檢測生物 IC 電路使否達到強健化的設計目標。如果步驟一的系統無法達到強健化設計目標，將利用定向演化技術，改變啟動子或 RBS 序列，使生物 IC 電路的基因群表現量產生變化，創造不同基因群表現強度的基因電路組合。依據生物電路的螢光表現蛋白輸出形式，挑選具有強健性表現之基因電路。回傳生物電路輸入及輸出訊號給合作子計畫，分析達成生物 IC 電路強健化重要因素。比對模擬與實驗結果，修正強健生物 IC 理論，再將新的生物電路設計圖回傳給本子計畫。本子計畫將以生物實驗驗證合作子計畫所設計之生物 IC 電路的強健性，並使其正確表現出設計功能，工作流程如下圖三。

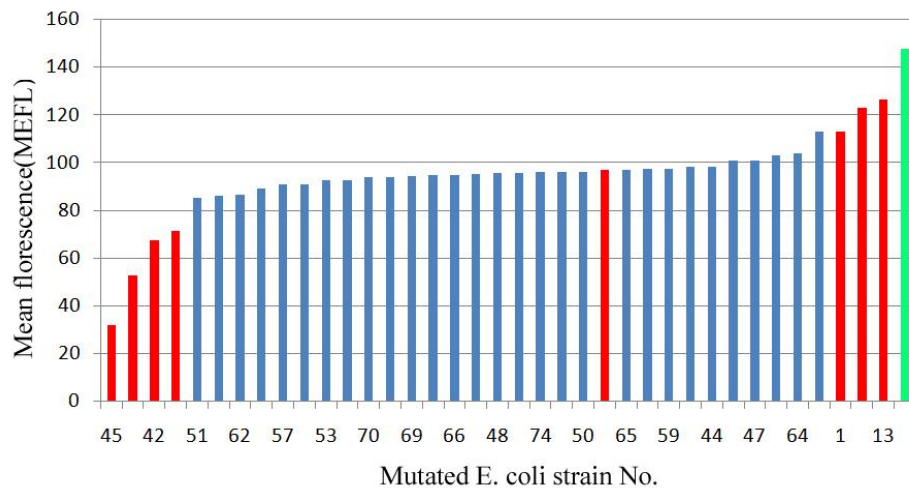


圖三：研究工作流程圖。

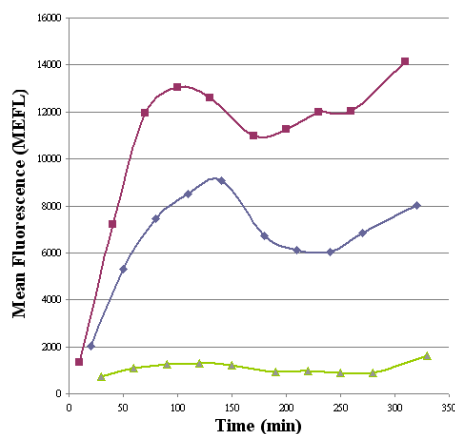
【結果】

一、利用定向演化技術擴增 RBS 序列的多樣性

要開出強健性電路設計規格，就會規定每一個基因的表現強度一定要在哪些範圍。生物學家拿到此設計藍圖，因為生物元件庫組合還不夠多，往往無法由生物元件庫中取得所需元件，為克服上述生物元件庫可調控元件不足的困難，本子計畫中利用定向演化技術，改良生物 IC 電路組裝無法逼近設計藍圖的問題。利用 error-prone PCR 技術、DNA shuffling 及 random point mutagenesis 等分生技術在 DNA 序列做一些突變，使啟動子轉錄強度或是 RBS (ribosome-binding site) 轉譯強度發生強化弱變化 (圖四及圖五)，擴增元件資料庫中啟動子 DNA 序列的多樣性，建立不同控制強度的生物 IC 元件資料庫。



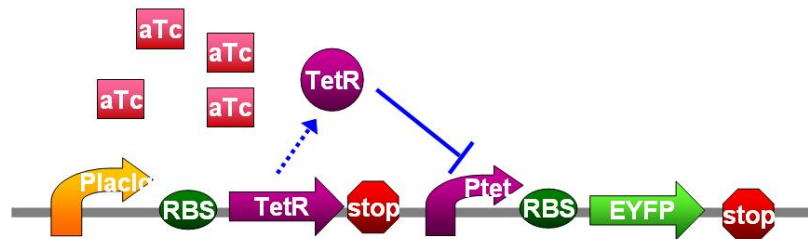
圖四：利用 random point mutagenesis 改變 ribosome-binding site 序列，造成綠螢光蛋白質產生速度差異，使基因迴路有不同螢光蛋白強度輸出。突變後可以產生一系列不同強度啟動子，實驗結果證實利用定向演化可以建立不同控制強度的生物 IC 元件資料庫。



圖五：利用 random point mutagenesis 改變圖螢光蛋白的 RBS 序列，造成基因迴路有不同螢光蛋白強度輸出。■◆：RBS 原始序列 (~AAAGAGGAG~)；◆：64 號樣品，RBS 突變序列 (~AAAGAGGAG~)；▲：40 號樣品，RBS 突變序列 (~AAAGACAGG~)。突變後表現減弱序列說明利用定向演化可以擴增元件資料庫中 DNA 序列的多樣性，建立不同控制強度的生物 IC 元件資料庫。

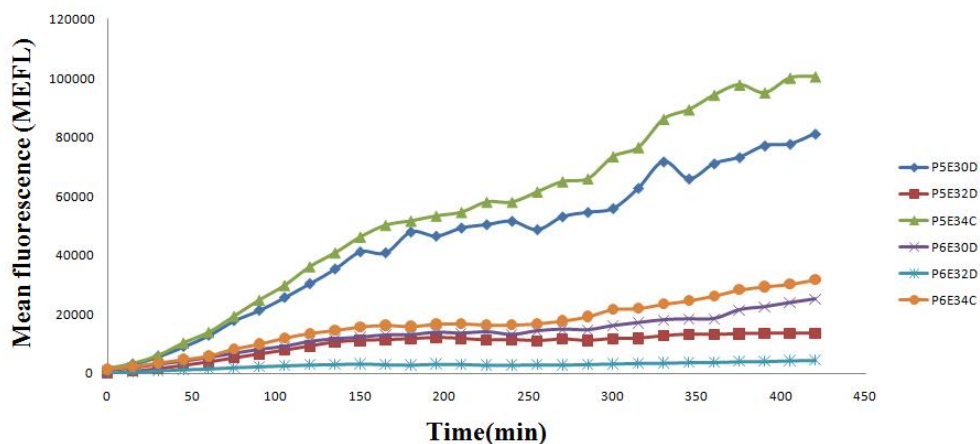
二、設計具有交互作用的生物 IC 電路來探討並驗證系統強設計理論

利用生物元件庫組裝出生物 IC 電路（圖六）。迴路中由持續性表現的 P_{lacIq} 啟動子表現出 tetR 抑制子蛋白，tetR 蛋白會抑制 P_{tet} 啟動子的表現，使系統不會表現出螢光蛋白 EYFP 基因。當系統中加入 tetR 蛋白之抑制物 anhydrotetracycline (aTc) 時，aTc 會解除 tetR 蛋白對 P_{tet} 啟動子的抑制作用，使綠螢光蛋白開始表現。



圖六：生物元件庫組裝出生物 IC 電路。 P_{lacIq} 啟動子表現出 tetR 抑制子蛋白抑制 P_{tet} 啟動子的表現，使系統不會表現出螢光蛋白 EYFP 基因。當加入 aTc 時，aTc 會解除 tetR 蛋白對 P_{tet} 啟動子的抑制作用，使螢光蛋白開始表現。

將構築好的生物 IC 電路接於表現質體上，轉殖大腸桿菌中，利用流式細胞儀分析螢光蛋白輸出形式及雜訊分佈情形，已經成功建立螢光蛋白定性及定量測試方法。我們量測生物元件的輸出訊號(螢光強度)及輸入訊號(DNA 序列及誘發物濃度)，實驗結果如圖七。將不同電路組合得到的綠螢光強度輸出訊號及外在干擾雜訊形式，回傳給合作子計畫，用以建立生物 IC 電路數學模型，改良強健系統設計理論。



圖七：利用擴增的 DNA 元件資料庫改變圖六生物 IC 電路組合，造成輸入訊號強度差異，使生物 IC 電路有不同螢光蛋白強度輸出。實驗結果說明組裝不同控制強度的生物 IC 元件資料庫可以創造出不同輸出的生物 IC 電路。

三、利用賽局理論設計強健性生物 IC 電路

現今已發表的生物 IC 電路面臨的難題是生物電路在細胞內表現短暫功能後會逐漸崩潰，無法穩定運作於細胞中，喪失實用價值。基因表達時的雜訊，不同 RNA 剪裁、DNA 突變及熱擾動等造成內在生化參數變動，以及細胞環境變遷與其他基因交互作用所造成的干擾，都會使人工製造出來的基因電路無法穩定運作。本子計畫與子計畫一合作，利用賽局理論設計強健性生物 IC 電路，使基因迴路表現能承受更多外加或內在雜訊干擾。並針對生物 IC 電路所受內在參數擾動及環境干擾，建立一套仿真的非線性隨機行為模型，根據此模型提出在各種干擾存在下，保證達成設計目標的生物 IC 電路設計規格。成果已發表於 *Bioinformatics* 2009. (Chen et al., 2009)。

【討論】

在強健性生物 IC 電路設計中，模型模擬出的參數值並不是直接對應到啟動子的調控強度，而且表現酵素的活性會隨其 mRNA 及蛋白質的穩定性有個別差異。所以在建構合成途徑的實驗初期，仍需要利用定向演化技術產生不同強度啟動子及 RBS 強度控制目標蛋白質群的表現量。藉由對應模型模擬和定向演化下所選擇出的最佳生物 DNA 元件輸出資料，列出模型模擬和啟動子序列資料調控活性的對照表，提供未來構築生物 IC 電路時，選擇最適合的調控強度啟動子及 RBS 序列的參考資料。此方式可以大幅縮短實驗時間，達到建構強健性生物 IC 電路的目標。

以定向演化改變啟動子及 RBS 序列，這會使啟動子轉錄強度及 RBS 轉譯強度改變，但是無法預估強度變化量。還好在*大腸桿菌*中，做定向演化只要數個工作天，而且一個人力同一天可以處理數個定向演化實驗樣品，可以由大量不同突變點的啟動子轉錄強度資料選取想要的突變菌株。同時實驗中也可以累積各種啟動子序列改變對轉錄強度的影響，由其中求出規則性，提供更有效率設計定向演化方向的策略。

【計畫成果自評】

本整合研究計畫執行至今，各子計畫執行進度與預期相符。鑑於目前相關文獻大多分開討論 promoter 在轉錄層級上的重要性以及 RBS 在轉譯層級上的必要性。因此，本子計畫提供了一個新的方法來重新定義 RBS 在轉錄、轉譯層級上的強度並確立其相關性。利用已知不同轉錄強度的 promoter 搭配已知不同轉譯強度的 RBS 建構成 9 條具有完整功能的表現單位(device)，並將其放入特定載體後送

入宿主 *E.coli* 表現之。目前已挑選其中六條 device 並分析其對應的數據，模擬結果與實驗結果相符程度符合當初預期結果。未來，本實驗室將完成並收齊 9 條 device 的實驗數據，利用這 9 條 device 探討 RBS 的 Translation 強度以及其表現蛋白的相關性。

此計畫之獨特性在於：利用系統分析模擬技術結合分子生物學概念，將 RBS 調控強度量化，以量化後數據建立生物中蛋白質表現動態模型，之後可針對設計者對蛋白質表現量的需求，組裝其相對應強度的 RBS 生物元件，調控蛋白質於宿主細胞內的表現量。

學術論文發表方面：由於本計畫建構 model 的方法具有其獨創性，加上想法上的新穎性。結合分子生物學及工程學之原理，將機電領域的系統設計理論應用至生物系統，設計並建造標準化及可交換性 DNA 序列，以構成各式生物元件。而這些生物元件與其他生物元件連結後，便能組成具有功能性的 device，執行不同的功能，進而控制細胞進行一系列的工作，將遺傳工程拓展到多基因的研究。因此，在跨領域期刊的接受度上，具有一定的前瞻性，目前有兩篇期刊論文正在撰寫中。已有一篇研討會論文獲邀至新加坡進行口頭演講（註一）。

國際競賽方面：2009 年指導交通大學生物科技學生團隊赴美參加 MIT 舉辦之國際基因工程競賽，以【細菌裁判】作品獲得銀牌獎，榮登交大首頁，校長並召開記者會表揚成果，獲得媒體廣泛報導，為台灣爭光。

國榮譽獎項：指導交通大學生物科技學生進行研究，成果榮獲中華創新發明學會之【台灣國際發明獎】。

註一：Hsiao-Ching Lee, Pei-Chun Shih, Yao-Te Tsai, Bor-Sen Chen, and Ching-Ping Tseng. Identifying the interaction function between promoters and ribosome binding sites. 2010 August 2-4, The 2nd international conference on cellular and molecular bioengineering

無衍生研發成果推廣資料

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李曉青			計畫編號：98-2221-E-009-182-				
計畫名稱：用系統工程方法設計強健生物 IC 電路--子計畫三：以定向演化達成合成途徑最佳化與驗證強健系統設計理論							
成果項目			量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）
			實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比		
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)	• 009 年指導交通大學生物科技學生團隊赴美參加 MIT 舉辦之國際基因工程競賽，以【細菌裁判】作品獲得銀牌獎，榮登交大首頁，校長並召開記者會表揚成果，獲得媒體廣泛報導，為學校爭光。 • 009 年指導交通大學生物科技學生進行研究，成果榮獲中華創新發明學會之【台灣國際發明獎】。
---	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與（閱聽）人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐ 已發表 ☐ 未發表之文稿 ☒ 撰寫中 ☐ 無

專利：☐ 已獲得 ☐ 申請中 ☒ 無

技轉：☐ 已技轉 ☐ 洽談中 ☒ 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本子計畫中引入定向演化技術，利用 error-prone PCR 技術、DNA shuffling 及 random point mutagenesis 等分生技術在 DNA 序列做一些突變，使 RBS (ribosome-binding site) 轉譯強度發生強化弱變化，擴增元件資料庫中 DNA 元件的多樣性，計畫中已建立不同控制強度的生物 IC 元件資料庫。此子計畫中並設計一個具有交互作用的生物 IC 電路來探討並驗證系統強健設計理論。迴路中的作用機制如下：由一個持續性表現的啟動子表現出 tetR 抑制子蛋白，tetR 蛋白會抑制 Ptet 啟動子的表現，使系統不會表現出螢光蛋白 GFP 基因。當系統中加入 tetR 蛋白之抑制物 anhydrotetracycline (aTc) 時，aTc 會解除 tetR 蛋白對 Ptet 啟動子的抑制作用，使螢光蛋白開始表現。我們可由各種不同調控強度組合的生物 IC 電路中，選取最接近設計藍圖的元件組合，創造出具有強健性生物 IC 電路。實驗過程將回傳生物電路輸入及輸出訊號給總計畫及合作子計畫，分析達成生物 IC 電路強健化重要因素。比對模擬與實驗結果，修正強健生物 IC 理論，再將新的生物電路設計圖回傳給本子計畫驗證強健系統設計理論。