

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 利用可控制生物元件及回饋設計增加基因迴路之穩定性 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 98-2311-B-009-002-

執行期間：98年03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

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：高敏志

大專生-兼任助理人員：吳劭易

大專生-兼任助理人員：林上偉

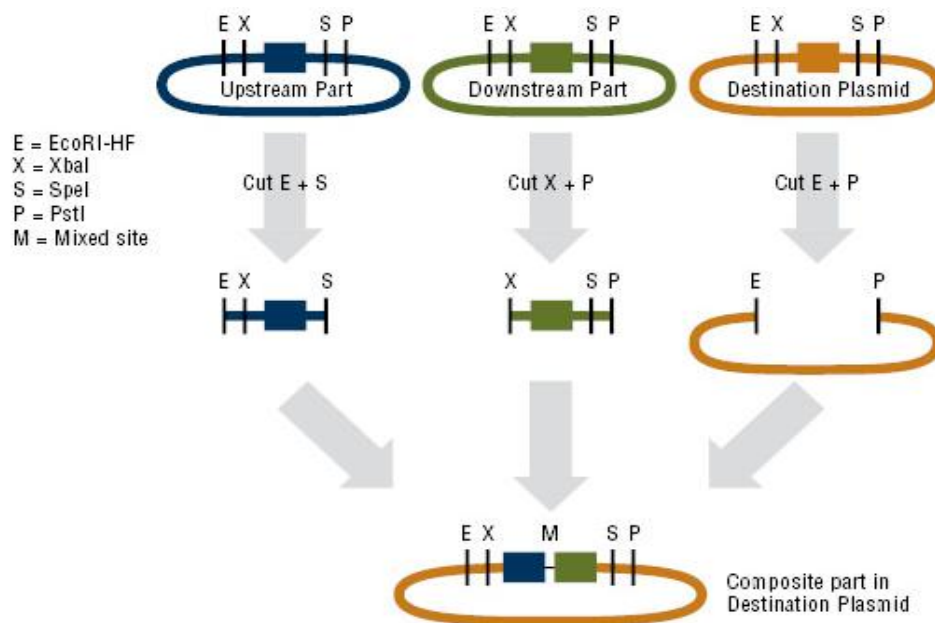
大專生-兼任助理人員：柯曉雲

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 99 年 12 月 23 日

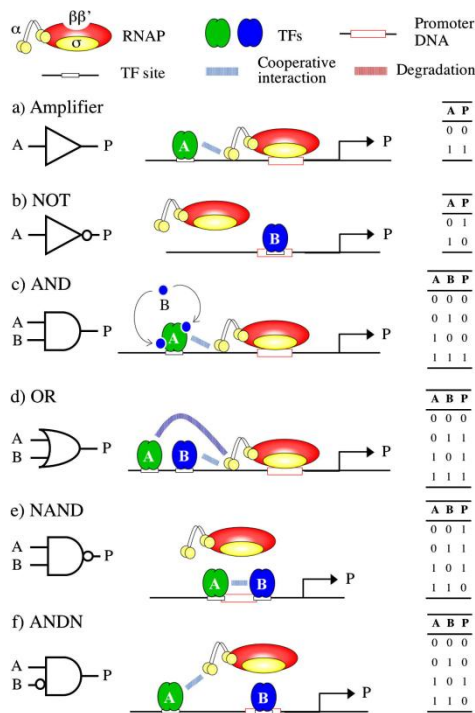
## 【前言】

合成生物學(synthetic biology)是21世紀開始發展的生物學的新興研究領域，其利用基因重組技術製造各種標準化生物 DNA 元件(biobricks)，組合成基因迴路(genetic 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。合成生物學領域有三大目標：一、有別於以往拆解生命的方式，其藉由建構生命來瞭解生命。二、將遺傳工程所使用的生物 DNA 元件標準化，統一限制酵素切位組合(圖一)，使生物 DNA 元件可以互相結合，創造出更多功能更複雜的系統。三、將機電領域的系統設計理論應用到生物系統，開拓重組生物與工程的交集，產生真正可由程式控制的生物。自2000年開始，合成生物學一詞開始在國內外各類學術刊物大量出現，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10大新技術之一”。



圖一：標準化之統一限制酵素切位之生物 DNA 元件組合方式。在標準化的 DNA 元件中，所有元件前端固定有 EcoRI 及 XbaI 切位，後端具有 SpeI 及 PstI 切位。DNA 元件內部序列如果出現這四種酵素切位，則需要用點突變將其序列改造，使 EcoRI、XbaI、SpeI 及 PstI 除了 DNA 元件前後端以外，沒有其他切點存在。當 DNA 元件序列標準化後，可以將欲組裝於上游的元件用 EcoRI 及 SpeI 酵素處理，組裝於下游的元件用 XbaI 及 PstI 酵素處理，連接於具有不同抗生素抗性的質體骨架上。組裝完成之 DNA 元件仍然會保有標準化的酵素切位。

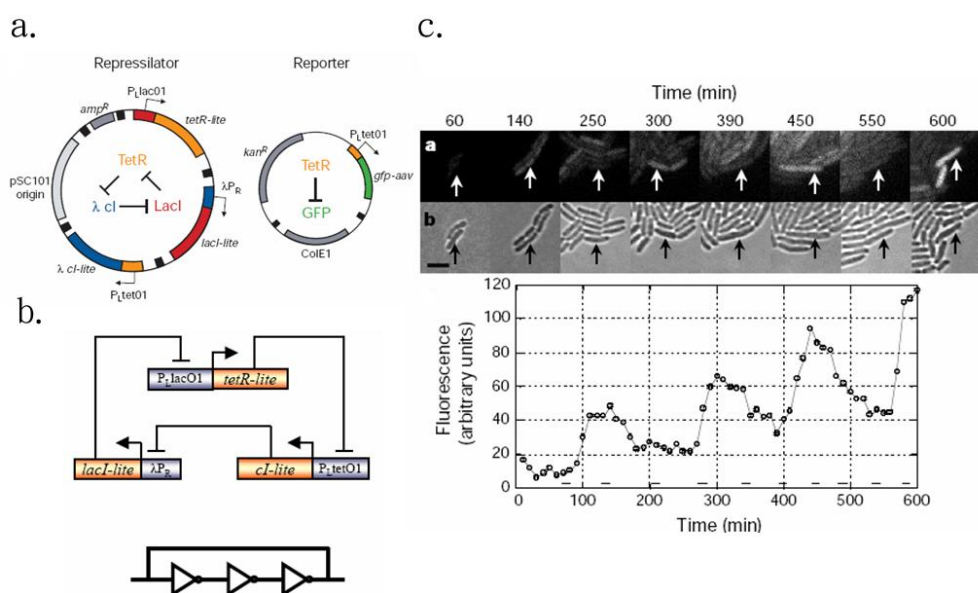
傳統遺傳工程學可在細菌或生物中嵌入少數基因，使生物體內目標蛋白質大量表現。但是在新興的合成生物學中，則是以更廣泛的規模重新設計生物體基因迴路，外加的將不是單一基因，而是要改變過去的單基因移轉技術，將基因群組裝為基因迴路後轉移至宿主細胞，使其表現出全新的基因調控網路(gene regulatory network)，創造出程式化控制生物行為。圖二表示出工程領域的邏輯閘(logic gate)，可以對應到基因間的調控模組(Silva-Rocha and de Lorenzo, 2008)。這些對應邏輯閘的生物基因調控模組即為合成生物學中最重要的概念—生物 DNA 模組。在工程理論中，只要組合適當的邏輯閘模組，即可設計出執行特定功能的電路。將此元件互換及邏輯閘模組組合的概念引入遺傳工程中，即可利用分子生物學技術，把生物 DNA 元件組成基因迴路，將遺傳工程拓展到多基因研究。



圖二：利用原核生物基因調控模組模擬工程邏輯閘。上方圖示列出調控啟動子活性的因子。RNAP：RNA 聚合酶，TF：轉錄因子。  
(a) Amplifier：有 TF 促使 RNAP 結合在啟動子區域，即有基因表現輸出；無 TF 輸入即無輸出。  
(b) NOT：抑制子(repressor)與啟動子區域結合使抑制作用存在，即無基因表現輸出。  
(c) AND：需要 TF A 及誘導物 B 一起存在，才會有基因表現輸出。  
(d) OR：TF A 或 B 只要一個存在，即有基因表現輸出。  
(e) NAND：兩個共同作用的抑制子存在，即無基因表現輸出。  
(f) ANDN：啟動子區域需要 TF A 存在和抑制子 B 不存在，才有基因表現輸出。(Silva-Rocha and de Lorenzo, 2008)

於 2000 年，首次成功製作出仿電子元件振盪器功能的人造基因迴路。美國普林斯頓大學的 Elowitz 及 Leibler 利用生物元件及綠螢光蛋白基因在大腸桿菌中製造了一個仿基本電路構造的基因迴路：環形振盪器(Elowitz and Leibler, 2000)。振盪器的基因迴路是帶有三個基因(tetR、lacI、 $\lambda$  cI)及啟動子區域的質體(圖三、a)。基因迴路設計是 LacI 抑制子(repressor)與 tetR 基因的啟動子結合， $\lambda$  cI 抑制子與 lacI 基因的啟動子結合，而 tetR 抑制子則與  $\lambda$  cI 基因的啟動子結合，這

種設計可用邏輯閘表示(圖三、b)。這種關聯性使得一個基因的抑制子蛋白能夠阻止 RNA 聚合酶與另一個基因的啟動子結合。因此，這三種蛋白的生成構成了一個振盪迴圈：大量 LacI 抑制子蛋白的生成抑制了 tetR 基因的表達；TetR 蛋白的不表現使  $\lambda$  cI 基因得以表達；而  $\lambda$  cI 蛋白又抑制 LacI 蛋白的生成，整個相互抑制的過程不斷進行振盪循環。而迴圈中的 tetR 啟動子與表達綠色螢光蛋白的基因相連，所以整個細菌會週期性表現綠螢光蛋白，閃爍發出綠色螢光(圖三、c)，成功以外加基因迴路控制生物行為。



圖三、生物振盪器。(a)振盪器質體包含三個抑制子基因及其啟動子區域，互相形成抑制迴路。(b) 振盪器基因迴路以邏輯閘電路圖形表示。(c)質體轉殖於大腸桿菌中，會使綠螢光蛋白週期性表現，使菌體閃爍發出綠色螢光。

數種以生物 DNA 元件組裝，可表現特定功能的基因迴路陸續被建構出來。例如 1.扳鍵開關基因迴路(toggle switch)：其利用兩個基因形成負回饋迴路，使基因表現像開關一樣，可以在兩個穩定狀態間切換(Gardner, et al., 2000)。2.自動抑制基因迴路(auto-repressor circuit)：讓抑制子進行負回饋，抑制本身啟動子區域，穩定基因輸出表現量(Hasty, et al., 2002)。3.生物距離感應器：引入 LuxI 基因元件，使基因迴路能感應與誘導物的距離，發出不同顏色的螢光(Basu, et al., 2005)。4.生物底片：將感光受器嵌入基因迴路中，使大腸桿菌能感應外界光線，在黑暗區的細菌會產生色素，因此將感應的影像顯現於培養皿中(Levskaya, et al.,

2005)。5.生物環境感測器：在圖二的生物振盪器架構中加入負回饋抑制作用，可以使螢光振盪更加穩定規律。感測器的閃爍頻率會受到環境影響，因此可以傳達關於環境的資訊(Stricker, et al., 2008)。6.生物計數器：利用 cis-repressor 的 DNA 短序列控制蛋白質轉譯作用，讓基因迴路可以記憶誘導物加入次數，當誘導物加入到所設定次數（目前最多記憶三次），基因迴路即會發出螢光訊號(Friedland, et al., 2009)。這些基因迴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，發表在 Nature、Science 等重要期刊。顯見在 21 世紀，由分子生物技術、生物資訊學及計算生物學整合的合成生物學，將會像現代的電子電機技術一樣迅速發展，在製藥、化合物、生質能源等領域廣泛應用(Sprinzak and Elowitz, 2005)。

### 【研究目的】

合成生物學與傳統基因工程不同之處，在於合成生物學是由工程系統的角度設計，尋找適當的生物控制元件組裝後來達成目標，存在 DNA 元件標準化、模組化的概念。DNA 元件上如果能夠標準化，可以促使基因迴路組裝更為迅速，並能預先參照標準化的 DNA 元件輸入及輸出訊號，模擬出組裝後基因迴路功能。合成生物學特色就是可以運用之前已做成的模組，繼續做進一步的基因迴路組裝，不必每次都從頭開始。因此成果是逐漸累積的，可以合併前人組裝出的生物元件，設計出更加複雜的基因調控網路，並可應用強大的工程工具(例如：電腦輔助設計)，來處理由此而來的複雜性。我們團隊搜索現有生物電路元件 DNA 序列，包括啟動子區域，核糖體連結序列（Ribosome binding site: RBS），抑制蛋白 DNA 序列，報導基因序列等，並參考現有的麻省理工學院架設的標準生物元件 (standard biological parts) 資料庫，取得生物元件 DNA 片段，建立出生物 DNA 元件庫。我們由元件庫中元件設計出一個具有特殊功能基因迴路「細菌裁判」，可將大腸桿菌改造為一種具有生物計時器及偵測細菌菌數功能的生物偵測器。此設計並獲得美國麻省理工學院舉辦的國際基因工程競賽(international Genetically Engineered Machine 2009; iGEM 2009)銀牌獎肯定。

我們研究團隊想要將「細菌裁判」基因迴路設計藍圖實現，達到可程式化控制生物的目標。雖然設計圖中所有基因迴路都已經組裝並定序完成，但是在嘗試組裝複雜基因迴路的實驗過程中，我們發現當基因迴路達到一定複雜性後，外加

的基因迴路即無法穩定運作於宿主細胞，宿主細胞有可能剔除部分外加基因群。而且基因迴路在細胞中會遭受外界環境及宿主細胞內部訊息干擾，造成基因迴路在表現短暫功能後會逐漸崩潰。基因迴路無法穩定運作的結果也在文獻報導中被提出。Endy 研究團隊也發現基因改造細菌在經過 50 代以上繁衍後，送入宿主細胞的基因迴路會在宿主細胞中產生突變，剔除部分基因群，破壞基因迴路的完整性(Canton, et al., 2008)。在圖三的生物振盪器中，雖然在一群細菌中都轉殖入相同質體，不過菌落間表現出的螢光強度、振幅及振盪頻率卻都不同步，有些菌落甚至喪失振盪功能。而且只要細菌生長進入停滯期(stationary phase)，所有基因迴路均會喪失功能，不再有振盪行為(Elowitz and Leibler, 2000)。為了解決此問題，許多工程領域的系統控制理論被引入合成生物學中，用來構築更穩定且可調控的基因迴路(Batt, et al., 2007; Chen, et al., 2009; Rosenfeld, et al., 2007; Wong, et al., 2007)。

本計畫主要目的為 (1)建立多樣化的生物元件資料庫，並且增加生物元件的可控制性。(2) 量測基因迴路輸入及輸出訊號，分析基因迴路調控的形式。(3) 利用實驗數據修正基因迴路運作的動態方程組，使基因迴路的表現可以由數學模型模擬再現，進一步預測出不同基因迴路運作的動態形式。

## 【文獻探討】

許多利用生物元件組成的小型基因迴路已經被建構出來，包括扳鍵開關基因迴路(toggle switch) (Gardner, et al., 2000)、自動抑制基因迴路(Hasty, et al., 2002)、生物距離感應器(Basu, et al., 2005)、生物底片(Levskaya, et al., 2005)、生物環境感測器(Stricker, et al., 2008)及生物計數器(Friedland, et al., 2009)等。2008 年發表的生物環境感測器迴路(Stricker, et al., 2008)是架構在 2000 年的振盪器迴路(Elowitz and Leibler, 2000)上，設計上加入負回饋迴路增加系統的強健性(robust)，研究成果再度發表於 Nature 期刊，顯示增加基因迴路在宿主細胞的穩定性及強健性是合成生物學發展的重要方向。

為建構穩定及強健性表現之基因迴路，有許多迴路設計理論被提出(Batt, et al., 2007; Chen, et al., 2009; Chen and Wu, 2009; Rosenfeld, et al., 2007; Wong, et al.,

2007)。利用工程控制理論先建構模擬基因迴路的方程組，可以在電腦上模擬基因迴路表現情形。藉由調整生物元件組成及數學模型的參數變化，使基因迴路在變動的生物體內仍可以穩定運作。清華大學電機系陳博現教授引入系統控制理論，將外界干擾及元件變動參數影響考慮在基因迴路中，設計出穩定表達功能的基因迴路，已經發表多篇基因迴路設計理論相關論文(Chen, et al., 2009; Chen, et al., 2008; Chen and Chen, 2008; Chen and Wu, 2009; Chen and Wu, 2008; Chen, et al., 2007)。雖然工程領域已經用電路控制概念設計基因迴路，但是依照工程理論建構出的基因迴路通常過於複雜，很難利用現有的生物元件庫架構出來，因此擴增可調控的生物元件庫並將其輸入及輸出訊號量化將是合成生物學的重要目標(Anderson, et al., 2007; Sayut, et al., 2007)。

麻省理工學院於 2004 年開始每年舉行關於“合成生物學”的國際性競賽—iGEM(international Genetic Engineering Machine: 國際基因工程生物競賽)，這個競賽的精神是以工程角度詮釋生物學，使用基因工程整體設計的概念與做法，先將各種特殊的 DNA 當成元件，製造生物性的標準裝置，再利用工程設計與分子生物學實驗方法，將基因迴路送入所想改造培育的生物體中，製造可調控之生物體。在過去數年中，參賽隊伍設計並實現了數十種新穎的生物機器，包括砷元素探測器、生物底片、生物振盪器等等。2007 年陽明大學系統生物學與合成生物學研究中心主任楊永正及生醫訊研究所教授張傳雄指導學生參加 iGEM，設計出「調控葡萄糖恆定的線路」，與哈佛、普林斯頓等知名大學一同奪得金牌獎。今年一共有 112 組來自世界各國的團隊參與競賽，交通大學團隊以可進行即時監控食物細菌數量的奈米級生物機器人「細菌裁判」，獲得銀牌獎肯定。由期刊發表趨勢及國際活動規模可以看出合成生物學是非常活躍的新領域，將電子電路設計的概念應用到細胞內的基因迴路設計，將是未來生物學的新興趨勢(Sprinzak and Elowitz, 2005)。

#### 【參考文獻】

- Anderson, J.C., Voigt, C.A. and Arkin, A.P. (2007) Environmental signal integration by a modular AND gate, *Mol Syst Biol*, **3**, 133.
- Basu, S., Gerchman, Y., Collins, C.H., Arnold, F.H. and Weiss, R. (2005) A synthetic multicellular system for programmed pattern formation, *Nature*, **434**, 1130-1134.

- Batt, G., Yordanov, B., Weiss, R. and Belta, C. (2007) Robustness analysis and tuning of synthetic gene networks, *Bioinformatics*, **23**, 2415-2422.
- Becskei, A. and Serrano, L. (2000) Engineering stability in gene networks by autoregulation, *Nature*, **405**, 590-593.
- Canton, B., Labno, A. and Endy, D. (2008) Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices, *Nat Biotechnol*, **26**, 787-793.
- Chen, B.-S., Chang, C.-H. and Lee, H.-C. (2009) Robust synthetic biology design: stochastic game theory approach, *Bioinformatics*.
- Chen, B.S., Chang, Y.T. and Wang, Y.C. (2008) Robust  $H_\infty$  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* **38**, 25-42.
- Chen, B.S. and Chen, P.W. (2008) Robust Engineered Circuit Design Principles for Stochastic Biochemical Networks With Parameter Uncertainties and Disturbances, *Biomedical Circuits and Systems, IEEE Transactions on*, **2**, 114-132.
- Chen, B.S. and Wu, C.H. (2009) A systematic design method for robust synthetic biology to satisfy design specification, *BMC Syst Biol*.
- Chen, B.S. and Wu, W.S. (2008) Robust filtering circuit design for stochastic gene networks under intrinsic and extrinsic molecular noises, *Mathematical Biosciences* **211**, 342-355.
- Chen, B.S., Wu, W.S., Wang, Y.C. and Li, W.H. (2007) On the robust circuit design schemes of biochemical networks: steady-state approach, *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, **1**, 91-104.
- Elowitz, M.B. and Leibler, S. (2000) A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators, *Nature*, **403**, 335-338.
- Friedland, A.E., Lu, T.K., Wang, X., Shi, D., Church, G. and Collins, J.J. (2009) Synthetic gene networks that count, *Science*, **324**, 1199-1202.
- Gardner, T.S., Cantor, C.R. and Collins, J.J. (2000) Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*, *Nature*, **403**, 339-342.
- Hasty, J., McMillen, D. and Collins, J.J. (2002) Engineered gene circuits, *Nature*, **420**, 224-230.
- Levskaya, A., Chevalier, A.A., Tabor, J.J., Simpson, Z.B., Lavery, L.A., Levy, M., Davidson, E.A., Scouras, A., Ellington, A.D., Marcotte, E.M. and Voigt, C.A. (2005) Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light, *Nature*, **438**, 441-442.
- Rosenfeld, N., Young, J.W., Alon, U., Swain, P.S. and Elowitz, M.B. (2007) Accurate prediction of gene feedback circuit behavior from component properties, *Mol Syst Biol*, **3**, 143.

- Sayut, D.J., Kambam, P.K. and Sun, L. (2007) Noise and kinetics of LuxR positive feedback loops, *Biochem Biophys Res Commun*, **363**, 667-673.
- Silva-Rocha, R. and de Lorenzo, V. (2008) Mining logic gates in prokaryotic transcriptional regulation networks, *FEBS Letters*, **582**, 1237-1244.
- Sprinzak, D. and Elowitz, M.B. (2005) Reconstruction of genetic circuits, *Nature*, **438**, 443-448.
- Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M.R., Mather, W.H., Tsimring, L.S. and Hasty, J. (2008) A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator, *Nature*, **456**, 516-519.
- Wong, W.W., Tsai, T.Y. and Liao, J.C. (2007) Single-cell zeroth-order protein degradation enhances the robustness of synthetic oscillator, *Mol Syst Biol*, **3**, 130.

## 【研究方法】

本計畫主要研究方向為增加基因迴路的可控制性，使架構出的基因迴路表現出想要的功能。一開始我們量測基因迴路輸入及輸出訊號，分析基因迴路調控的雜訊分佈，之後利用實驗數據修正基因迴路運作的動態方程組，使基因迴路的表現可以由數學模型模擬再現，進一步預測出不同基因迴路運作的動態形式。

研究方法如下：

### (1)建立多樣化生物元件序列資料庫，增加基因迴路元件的可選擇性：

啟動子及 RBS (ribosome binding site) 調控目標蛋白質表現強度是設計基因迴路時需要考慮的重要因素。需要有不同的轉錄強度的啟動子和不同轉譯強度的 RBS 供基因迴路設計取用，才能依照設計強度表現外加基因，構築更精密且穩定的基因迴路。正如在電機領域，需要依照電路設計選用不同規格的電容、電阻元件，才能組合出具有正確功能且能穩定執行功能的電路。

### (2)測量啟動子轉錄活性及 RBS 轉譯活性強度，量化輸入和輸出訊號：

將螢光蛋白接於啟動子及 RBS 序列後，藉由測量螢光蛋白強度得到啟動子轉錄與 RBS 轉譯活性。當輸入和輸出訊號可以量化，輸入訊號在基因迴路中的傳遞才可以被追蹤及模擬。

### **(3)依據設計組裝出可控制輸出，並具有回饋設計之穩定基因迴路：**

以目標(1)-(2)提供的生物元件，依設計組裝於質體中，轉殖入 2 宿主細胞中，建構出 2 基因迴路。之後於迴路中替換不同的基因元件組成，量測螢光基因輸出訊號，分析每種狀態下系統的穩定性。

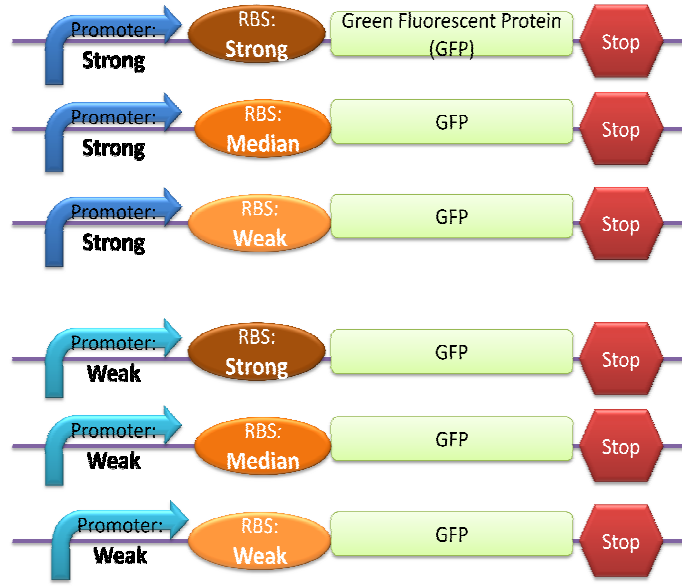
### **(4)利用實驗結果修正動態方程組，建立更能模擬真正基因迴路運作的數學模型。**

依據實驗結果分析當系統受到外界環境或宿主細胞內部訊號干擾時，輸出螢光強度的改變情形。可以將輸出雜訊及環境干擾因子加入方程組中，修正基因回饋迴路方程組，模擬出更趨近現實運作的數學模型。

## **【結果】**

### **一、定量啟動子和 RBS 之間的交互作用**

當目標蛋白質的生成量可以被精細的操縱時，基因迴路在細胞的表現行為才能被設計及控制。蛋白質的表現量主要被啟動子的轉譯強度及 RBS 的轉錄強度控制，然而目前卻沒有文獻提出有效的方法定量啟動子和 RBS 之間的交互作用。為了探討這一問題，我們選擇兩種強度的啟動子及三種強度的 RBS，設計了 6 條簡單的綠螢光蛋白表現迴路（圖四），轉殖於 E.coli 中，利用流式細胞儀量測綠螢光蛋白隨時間的表現量變化，將綠螢光蛋白表現強度可視為基因迴路的輸出訊號，可藉此估算出(1)啟動子轉錄強度(2)RBS 轉譯強度及(3)啟動子和 RBS 間的交互作用隨時間的變化量。



圖四、利用兩種強度的啟動子及三種強度的 RBS 所建構的 6 條簡單的基因表現迴路。

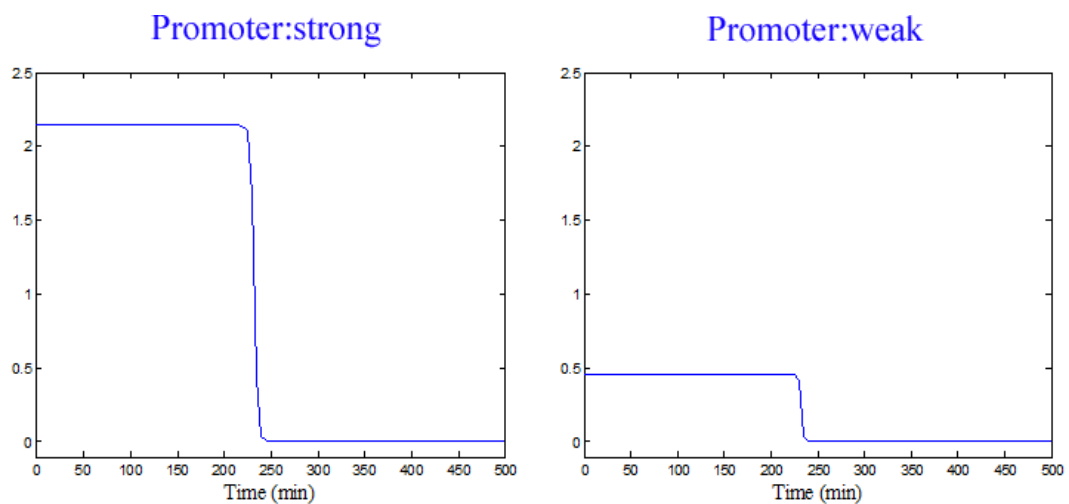
我們利用下列模型表示啟動子跟 RBS 間的交互關係：

$$\begin{aligned}\dot{x} &= r_p(t) - \alpha x - d(t)x \\ \dot{X} &= r_R(t)x - \beta X - d(t)X\end{aligned}$$

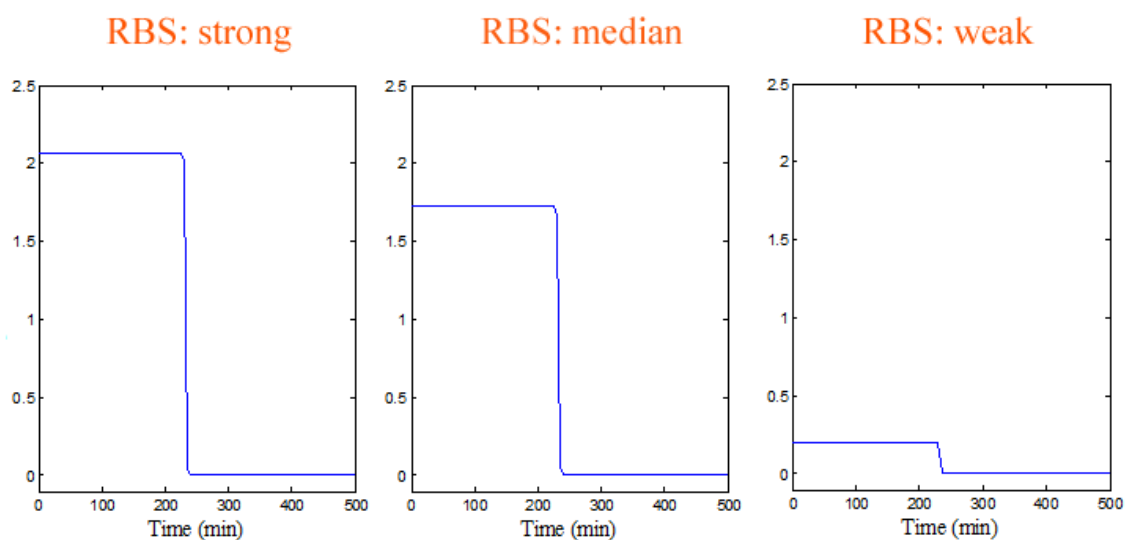
其中  $x$  為細胞中的 mRNA 濃度， $r_p$  是啟動子轉錄強度， $\alpha$  是 mRNA 降解速度， $d(t)$  是細胞分裂所引起的 mRNA 和蛋白質的稀釋， $X$  為細胞中的蛋白質濃度， $r_R$  是 RBS 序列轉譯強度， $\beta$  是蛋白質降解速度。在模型中，mRNA 濃度對時間的變化量等於啟動子轉錄出 mRNA 的速度，減掉 mRNA 的降解量，再減去因為細胞分裂因起的濃度降低。蛋白質濃度對時間的變化量等於 RBS 將 mRNA 轉錄出蛋白質的速度，減掉蛋白質的降解量，再減去因為細胞分裂因起的濃度降低。細菌生長可分為對數生長期及停滯期。在停滯期中，轉錄及轉譯速度會大幅降低，因此模型中以 Hill 方程式描述  $r_p$  及  $r_R$ 。

$$r_p(t) = \frac{r_{p0}}{1 + e^{(t-\mu)/\sigma_p}},$$

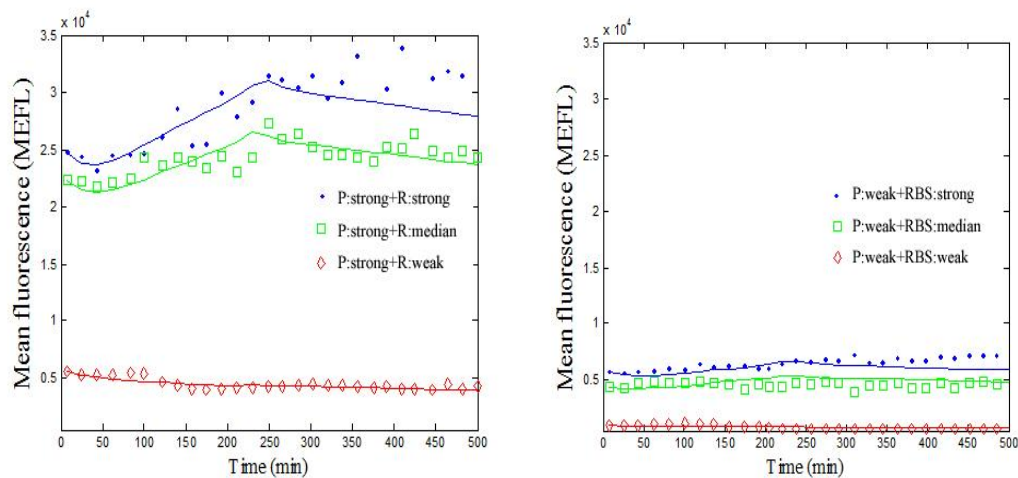
轉折點  $\mu$  設定為細菌從對數生長期切換到停滯期的時間點。而模型中的  $d(t)$  則可由細菌的菌數求得。將實驗數據以非線性回歸解出模型中各參數，就可以得到每一個啟動子元件的轉錄強度（圖五）和 RBS 元件的轉譯強度（圖六），及元件的轉錄強度，轉譯強度。非線性迴歸結果如圖七，模擬結果與實驗數據趨勢吻合，表示我們的數學模型合理。



圖五：強弱兩種啟動子元件的轉錄強度隨時間的變化量。



圖六：強中弱三種 RBS 元件的轉譯強度隨時間的變化量。



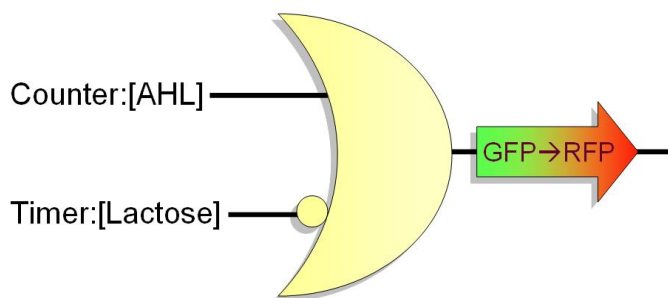
圖七：兩種強度的啟動子及三種強度的 RBS 所建構的基因迴路中，綠螢光蛋白隨時間的變化量。圖形點為實驗數據，實線為非線性迴歸模擬結果。

## 二、具有 OR 邏輯閘功能之基因迴路之設計與構築

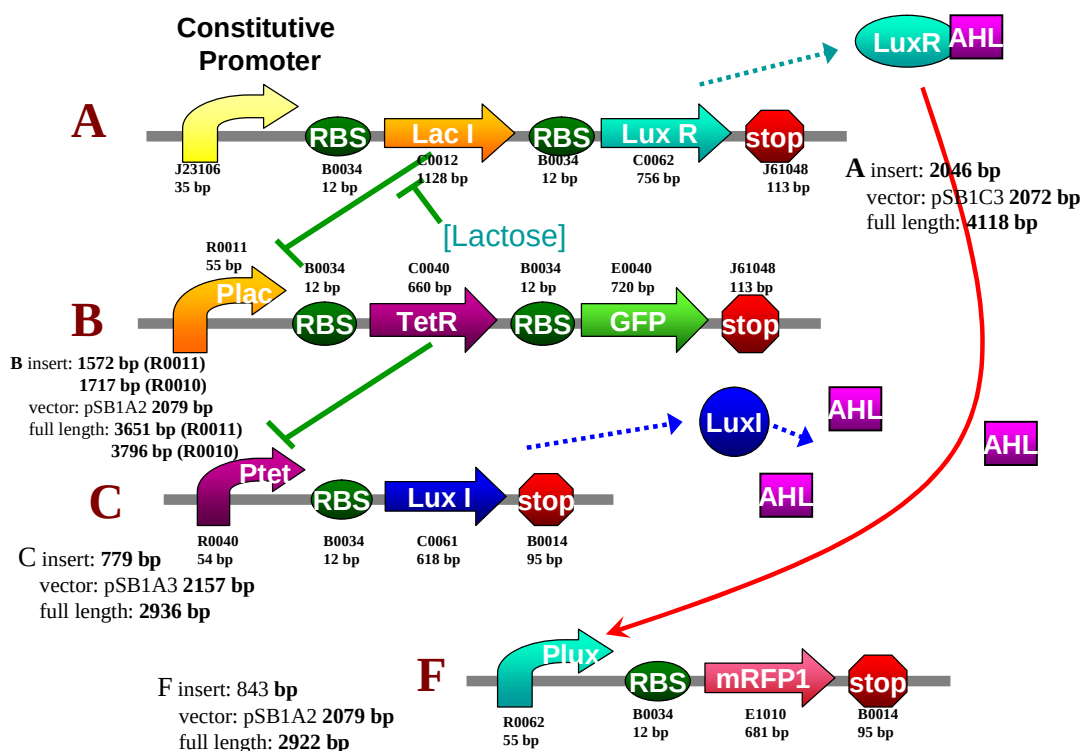
賣場的生鮮食物或熟食通常受到細菌污染或超過保存期限後即會丟棄，但食物存放期間是否受到細菌污染，卻是無法即時使用儀器偵測的。為了克服這個難題，本計畫設計一個可即時監控的基因改造大腸桿菌，它可以偵測食物是否遭受外來細菌入侵，並設定定時器功能，依照設定條件發出綠光（安全），黃光（警戒），紅光（危險）等螢光訊號，幫助消費者判斷食物是否在安全保存期限之內或遭到細菌污染。利用生物 IC 設計概念，本計畫設計出一種生物 OR 邏輯閘，其可接收 Acyl-homoserine lactone (AHL) 及乳糖 (Lactose) 兩種形式外來訊號（圖八）。當 AHL 累積至一定濃度，或培養基中乳糖耗盡時，基因迴路即會輸出訊號逐步由綠螢光轉換為黃螢光，最後顯示至紅螢光輸出。將此種生物 OR 邏輯閘組裝到大腸桿菌中，可以將大腸桿菌改造為一種具有計時器及偵測細菌菌數功能的生物偵測器。

細菌裁判設計如圖九，基因迴路由 ABCF 四條 DNA 迴路組成。A 條 DNA 由持續表現的啟動子所驅動，會不斷產生 LacI 蛋白質及 LuxR 蛋白質。當乳糖未加入前，A 條 DNA 上的 LacI 蛋白質會抑制 B 條 DNA 的 Lac 啟動子，使綠螢光蛋白無法產生，此時細菌裁判呈現無色。當乳糖加入後，乳糖會與 LacI 蛋白質結合，使得 LacI 蛋白質無法抑制 Lac 啟動子，B 條 DNA 上的綠螢光蛋白

開始產生，細菌裁判呈現綠色，此時執行計時器功能，開始計時。當 B 條 DNA 開始轉錄作用時，TetR 蛋白質會不斷產生，抑制 C 條 DNA 的 TetR 啟動子，使 LuxI 蛋白質 (AHL synthase) 無法合成 AHL。缺少 AHL 即無法與 LuxR 蛋白質形成轉錄因子，活化 F 條 DNA，故紅螢光不表現。但當乳糖消耗完畢，或外界細菌入侵時所釋出多量的 AHL，會使得 F 條 DNA 上的紅螢光蛋白基因產生，使細菌裁判呈現紅色，提醒食物已放置太久，或有細菌入侵，勿再食用。



圖八：具有計時器及偵測細菌菌數功能的生物 OR 邏輯閘。外來細菌會釋放出 AHL 化學分子，當基因迴路感測到 AHL 存在時，輸出訊號會由綠螢光切換黃螢光，最終到紅螢光輸出，此功能可以利用來偵測細菌菌數。或者當培養基中乳糖耗盡，基因迴路即會將輸出訊號逐步由綠螢光轉換為黃螢光，最後顯示到紅螢光輸出。控制培養基中乳糖濃度，即可以控制輸出訊號切換時間，此部分可以做為生物計時器。

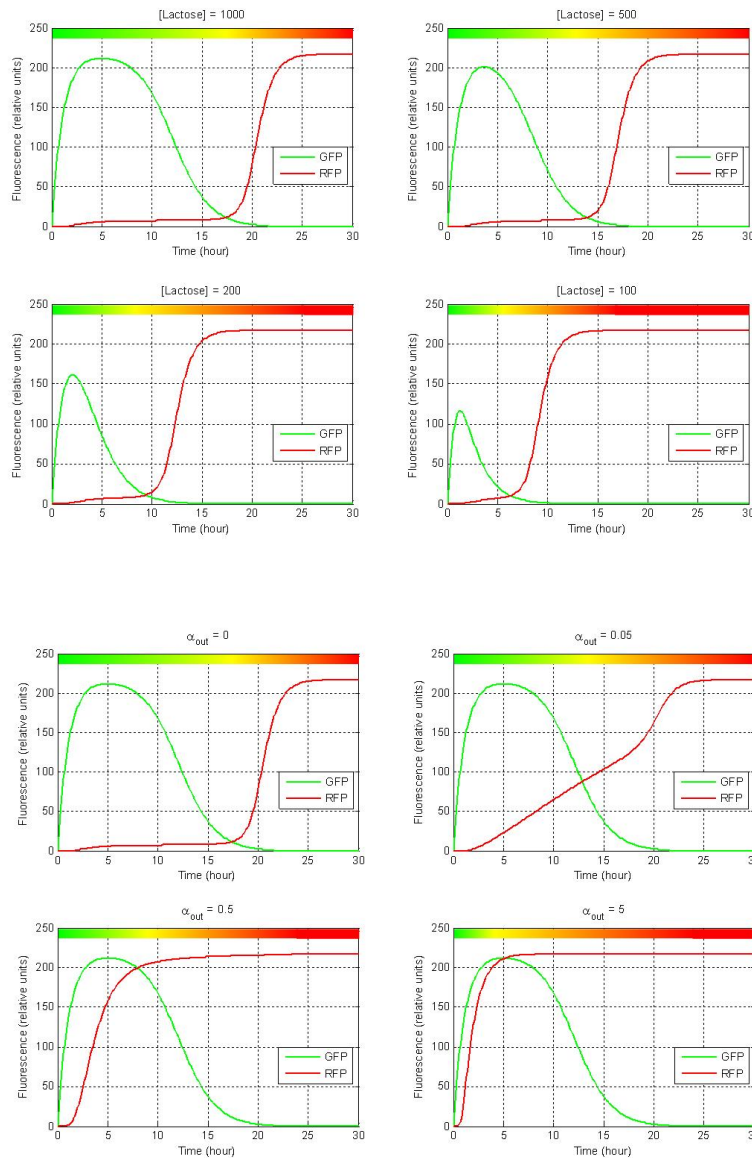


圖九：細菌裁判具有計時器及偵測細菌菌數功能的生物 OR 邏輯閘基因迴路設計圖。基因迴路包含四條 DNA，其中 A、B 及 D 條組合後可以執行計時器功能。計時時間長短可以培養基中乳糖濃度控制，當乳糖被大腸桿菌消耗殆盡，培養基顏色即會由綠色轉變紅色。A 及 D 條組合後可以執行偵測細菌菌數功能，當細菌入侵系統時，細菌會釋出過量 AHL 和 LuxR 蛋白質結合，驅動  $P_{lux}$  啟動子，使紅螢光蛋白開始產生，培養基顏色會轉變為紅色，警示有外界細菌入侵。

架構數學方程組模擬基因迴路，利用模擬預測基因迴路的表現情形。方程組如下，其中  $a$  是啟動子表現下游蛋白質強度， $g$  是相對應蛋白質的降解速度。

$$\begin{aligned}
 A-line \quad & \begin{cases} \frac{d}{dt}[lacI] = a_A - g_{lacI}[lacI] \\ \frac{d}{dt}[luxR] = a_A - g_{luxR}[luxR] \\ \frac{d}{dt}[lact] = -k_1[lact] \end{cases} \\
 B-line \quad & \begin{cases} \frac{d}{dt}[GFP] = \frac{a_B}{1 + \left\{ \frac{[lacI]}{[lact]} \right\}^{n_1}} - g_{GFP}[GFP] \\ \frac{d}{dt}[tetR] = \frac{a_B}{1 + \left\{ \frac{[lacI]}{[lact]} \right\}^{n_1}} - g_{tetR}[tetR] \end{cases} \\
 C-line \quad & \begin{cases} \frac{d}{dt}[luxI] = \frac{a_C}{1 + [tetR]^{n_2}} + a_{out} - g_{luxI}[luxI] \\ \frac{d}{dt}[AHL] = k_2[luxI] \end{cases} \\
 D-line \quad & \begin{cases} \frac{d}{dt}[RFP] = \frac{a_F([AHL][luxR])^{n_3}}{K + ([AHL][luxR])^{n_3}} - g_{RFP}[RFP] \end{cases}
 \end{aligned}$$

依據上述方程組代入合理數值，即可預測菌體內螢光對時間的變化情形（圖十及圖十一）。模擬結果顯示培養基中乳糖濃度降低為原先的 1/10，會使紅螢光蛋白由原先 20 小時出現加快到 8 小時出現，證實調整乳糖濃度可以有效控制生物計時器的計時時間（圖十）。另外當有外界細菌入侵時，外界細菌體中的 LuxI 合成酶會使得 AHL 濃度增加，加速紅螢光蛋白出現，使大腸桿菌可依據入侵菌數調整紅螢光蛋白表現時間（圖十一）。模擬結果顯示我們設計的基因迴路可以有效地執行生物計時器及偵測細菌的功能。



圖十：生物計時器功能模擬圖。在乳糖濃度 1000（模擬數值，非實際濃度單位）時，綠螢光蛋白在第 5 小時之後會逐漸降解，紅螢光蛋白在第 20 小時開始出現。當培養基同時存在紅綠螢光蛋白時，培養基會呈現出黃色。圖上方的色條指示出培養基呈色情形。當乳糖濃度逐漸降低，紅螢光蛋白會加快表現時間。顯示利用培養基中乳糖濃度，可以控制生物計時器的計時時間長短。

圖十一：基因迴路偵測入侵細菌功能模擬圖。培養基中乳糖初始濃度均固定為 1000（模擬數值，非實際濃度單位）當無外界細菌入侵，即  $\alpha_{out} = 0$  時，紅螢光蛋白在第 20 小時開始出現。當過量細菌入侵，會加速紅螢光蛋白表現。使培養基顯現紅色，提醒我們系統已經被細菌污染。顯示此基因迴路可以有效偵測入侵細菌數量並發出警示。

利用上述實驗成果開發出基因改造大腸桿菌「細菌裁判」，可以偵測外來細菌入侵數量及設定定時器功能，依照所設定條件發出綠光(安全)，黃光(警戒)，紅光(危險)等螢光訊號。利用螢光訊號可以判斷食物是否在安全保存期限之內。「細菌裁判」基因迴路設計在美國麻省理工學院舉辦的國際基因工程競賽(international Genetically Engineered Machine 2009; iGEM 2009)中，獲得銀牌獎肯定。目前四條 DNA 已經完成組裝並定序完成，正在進行每條 DNA 功能測試。之後將會完整組裝於大腸桿菌中，測量其螢光輸出是否符合預期，並提供數據做為未來基因迴路設計參考。

## 【討論】

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。然而目前卻沒有文獻提出有效的方法定量生物元件的轉錄或轉譯強度。本計畫中設計出一簡單基因迴路，節油量測螢光訊號輸出，將實驗數值代入數學模型中，即可計算出(1)啟動子轉錄強度(2)RBS 轉譯強度及(3)啟動子和 RBS 間的交互作用隨時間的變化量。當 DNA 生物元件的情度可以被定義，之後就能建立不同控制強度的生物 IC 元件資料庫。由其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。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。

表現蛋白的活性會隨其 mRNA 及蛋白質的穩定性有個別差異，所以在初期實驗中，因為生化參數數據不足，動態方程組不一定可以模擬出基因迴路動態，只能預測出大概行為趨勢。不過可以先組裝出可運作的基因迴路，利用實驗結果回推各種生化參數的值，解出數學模型中的未知參數值。實驗中也可以累積不同元件組合對生化參數值的影響資料，由其中求出架構穩定基因迴路之規則性，提供更有效率設計基因迴路的策略。

利用數學模型模擬出穩定基因迴路的動態，模擬所提供的是迴路中每一個基因表現量的控制範圍。但是啟動子轉錄強度是以嵌入螢光蛋白報導質體中，所表現出的螢光強度定量，測出的是啟動子間轉錄強度的相對值，不能直接對應到計算結果。解決方式是將不同強度啟動子替換入基因迴路中，將每次實驗結果代入基因迴路的動態方程組中，回推計算不同啟動子強度實際所對應的方程組的參數值。當實驗累積足夠的實驗資料，即可以列出方程組中參數和啟動子轉錄強度的對照表。之後，即可根據對照表，選擇最適合的調控強度啟動子組裝基因迴路，大幅縮短實驗時間，達到組裝穩定基因迴路之目標。

## 【計畫成果自評】

本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啟動子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啟動子搭配已知不同轉譯強度的 RBS 建構成 12 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 12 條 device 的實驗數據，利用這 12 條 device 探討 RBS 的轉錄強度以及其表現蛋白的相關性。

在生物基因迴路組裝與測試方面，目前細菌裁判已全部組裝完畢，僅需將其移至 Low copy number 的 backbone—pSB3K3 (copy number: 20~30) 後，即可測試整個系統功能是否如預期表現。之後將量測基因迴路輸入及輸出訊號，分析基因迴路調控的雜訊分佈，之後利用實驗數據修正基因迴路運作的動態方程組，使基因迴路的表現可以由數學模型模擬再現，進一步預測出不同基因迴路運作的動態形式，達到控制生物行為之目標。

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，將啟動子與 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：由於本計畫建構數學模型模擬生物基因迴路的方法具有其獨創性及新穎性。計畫中並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。2010 年以【蚊子終結者】作品再次獲得銀牌，現見此研究領預支重要性。

國內榮譽獎項：指導交通大學生物科技學生進行研究生物基因迴路的設計與組裝，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

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2010/11/02

|           |                               |                  |
|-----------|-------------------------------|------------------|
| 國科會補助計畫   | 計畫名稱：利用可控制生物元件及回饋設計增加基因迴路之穩定性 |                  |
|           | 計畫主持人：李曉青                     |                  |
|           | 計畫編號：98-2311-B-009-002-       | 學門領域：生物學之生化及分子生物 |
| 無研發成果推廣資料 |                               |                  |

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：98-2311-B-009-002- |                 |            |     |                                     |
|-------------------------------|-------------|-----------|-------------------------|-----------------|------------|-----|-------------------------------------|
| 計畫名稱：利用可控制生物元件及回饋設計增加基因迴路之穩定性 |             |           |                         |                 |            |     |                                     |
| 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       | 1                       | 1               | 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      | 1                       | 1               | 100%       | 篇   |                                     |
|                               |             | 研究報告/技術報告 | 0                       | 0               | 100%       |     |                                     |
|                               |             | 研討會論文     | 1                       | 1               | 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<br>(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。) | <p>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。</p> <p>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】。</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|           | 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）

啟動子及 RBS (Ribosome binding site) 調控目標蛋白表現強度是設計基因迴路時需要考慮的重要因素。因此，需要有不同的轉錄強度的啟動子及不同轉譯強度的 RBS 組合，方可供基因迴路設計取用，才能依照設計強度表現外加基因，構築更精密且穩定的基因迴路。正如電機領域中，需要依照電路設計選用不同規格的電容、電阻元件，方能組合出具有正確功能且能穩定執行功能的電路。因此，本實驗將綠螢光蛋白接於不同強度的 Promoter 及 RBS 序列之後，藉由測量螢光蛋白強度得到啟動子轉錄強度的 PoPS。實驗數據經分析模擬後發現，本實驗所使用之強度較強的啟動子與強度較強的 RBS 配對組合後，隨著菌數濃度的增加，螢光強度有逐漸上升的趨勢；反之，強度較弱的啟動子與強度較弱的 RBS 配對組合後，隨著菌數濃度的增加，螢光強度卻有漸趨下降的現象。此外，本實驗亦建立一個動態模組，可計算出當細菌生長從對數期至靜止期時，啟動子轉錄的強度，及 RBS 轉譯的強度。藉由這個即可重新定義啟動子與 RBS 間的交互作用關係。由於本計畫建構數學模型的方法具有其獨創性。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。