

iGEM Handbook

Edited by Team Tianjin

All rights reserved

目录

| | | |
|----|--------------------------------------|----|
| 一、 | 我们为什么要参加 iGEM..... | 1 |
| 1. | iGEM 比赛介绍..... | 1 |
| 2. | iGEM 比赛流程..... | 2 |
| 3. | 我国参赛情况..... | 3 |
| 4. | iGEM 比赛获奖要求..... | 3 |
| 1) | iGEM 奖牌..... | 3 |
| 2) | 组别奖..... | 6 |
| 3) | 特别奖..... | 6 |
| 4) | 决赛入围队..... | 6 |
| 5. | iGEM 能给我什么..... | 7 |
| 二、 | iGEM 建队指南..... | 9 |
| 1. | 队伍的概念..... | 9 |
| 2. | 招募成员..... | 9 |
| 3. | 资金准备..... | 10 |
| 4. | 知识与技能的培训与考核..... | 10 |
| 5. | 选定题目..... | 11 |
| 三、 | 优秀队伍项目展示..... | 13 |
| 1. | 2014 年帝国理工学院 Aqualose 项目..... | 13 |
| 1) | 概述..... | 13 |
| 2) | 项目内容..... | 14 |
| 2. | 2014 年国立交通大学 Operation Debug 项目..... | 17 |
| 1) | 实验背景..... | 17 |
| 2) | 项目内容..... | 18 |
| 3) | 项目分析..... | 20 |
| 3. | 2014 年海德堡大学 The Ring of Fire 项目..... | 21 |
| 1) | 项目背景..... | 21 |
| 2) | 项目内容..... | 21 |
| 3) | 总结..... | 23 |

| | | |
|----|------------------------------|----|
| 4. | 2010 年华盛顿大学免疫学项目 | 25 |
| 1) | 项目背景 | 25 |
| 2) | 革兰氏阴性细菌项目 | 25 |
| 3) | 新型炭疽热治疗方案 | 29 |
| 4) | 项目分析 | 31 |
| 四、 | 附录 | 32 |
| 1. | 招募队员举例——北京化工大学 2015 | 32 |
| 2. | 专业知识举例——生物模块 | 33 |
| 3. | 培训课程举例——北大 2015 前期培训安排 | 34 |
| 4. | 教材和参考资料——北京大学 iGEM | 36 |
| 5. | 考核形式参考——2013 复旦培训理论测试 | 38 |
| 五、 | 鸣谢 | 41 |

一、 我们为什么要参加 iGEM

1. iGEM 比赛介绍

国际遗传工程机器设计竞赛（International Genetically Engineered Machine Competition, iGEM）始于 2005 年，每年由美国麻省理工学院（Massachusetts Institute of Technology, MIT）主办，是合成生物学（Synthetic Biology）领域的最高国际性学术竞赛。

iGEM 的前身是麻省理工学院一门有关设计生物系统课程，2004 年校内有 5 支队伍就此课题进行了比赛。2005 年，这项比赛成为国际赛事，有 13 支队伍参赛。此后参加比赛的队伍越来越多，2011 年参加比赛队伍的数量就增长到 165 支，并首次出现地区赛。同年，iGEM 基金会从麻省理工学院分离，成为独立组织，并创办第一届高中组比赛。2012 年，企业组



比赛出现。2015 年更是有来自 30 多个国家的多达 280 支队伍参加比赛。

iGEM 希望我们从了解自然的生物系统入手，构建标准化的生物模块，进而改进已有的或设计崭新的人工生物系统。其要求各支参赛队伍——往往代表自己的学校——在暑假期间利用标准生物模块数据库中现有的、或自己重新设计的标准化生物学模块组装表达载体，构建生物系统，并在活细胞内实现可控的表达和操纵。各团队还需对自己设计的生物系统或模块的各个性质进行测定，并注册在数据库中，成为新的标准模块，供全球的科学家共享，从而使学生的创新成果拥有更为深远的学术价值和潜在应用价值。在项目完成后，各队将会参加一个大型的聚会形式的比赛，展示各自的成果，并进行交流。每年的竞赛受到《Nature》，《Science》等国际权威科学杂志，以及 BBC 这样的传统媒体的关注和专题报道。

iGEM 大赛具有很高的自由度，学生可以自主选题，利用课余时间完成所需要的实验。这些充分锻炼了学生的独立工作能力和团队协作能力，同时也激发了学生对于科学研究的热情。虽然大赛对于各团队所进行的生物系统工程内容没有做限定，但是各队所构建的人工生物系统通常可以分为以下几个大类：新应用、食物、能源、基础性进步、健康/医学、环境、制造、测量、信息处理、软件工具等。

除了生物工程项目之外，iGEM 大赛还要求各支团队的项目中包含 Human practice 和 Safety 两块内容，目的是在项目中体现人文关怀，讨论合成生物学对于社会和公众的影响，普及和宣传合成生物学知识，并客观地讨论其潜在的安全威胁。

2. iGEM 比赛流程

以 2015 年的赛程为例，各支团队在五月完成注册，并收到一份包含所有注册在库中的标准生物模块，以此开始运作自己的项目。各队利用暑假在自己的学校或实验室中完成自己的设计与构建，并在九月中旬完成实

验任务和网站（作为项目成果的展示）的制作，随后前往波士顿参加 Giant Jamboree 进行比赛。从注册比赛到颁奖共 5 天，最后一天就会公布 iGEM 最终大奖和其它各奖项的归属。比赛时每个队伍有 20 分钟时间做展示，5-10 分钟回答评委和观众的问题。同时每个队伍需制作一张海报，比赛期间有 Poster 环节，向别人介绍自己的项目（展示一般会在多个会场同时进行，不可能全都听到，所以可以通过海报了解别的队伍）。

3. 我国参赛情况

我国的高校自 2007 年开始参加 iGEM。首年共有清华大学、北京大学、天津大学、中国科技大学以及台湾地区的国立阳明大学 5 支队伍参赛，并全部获得金奖，北大更是取得了总冠军的好成绩。这几年来，越来越多的中国高校参与到 iGEM 的比赛当中。到 2015 年，已有来自中国大陆及港澳台地区的 50 多所学校参赛，如清华、天大、中科大及北理工等传统强队更是派出多支队伍参赛。

4. iGEM 比赛获奖要求

iGEM 的奖项可以分为奖牌、组别奖、特别奖和大奖。

1) iGEM 奖牌

和我们对金、银、铜奖牌的传统认识不同，所有队伍在 iGEM 大会上都有机会获得奖牌。奖牌的数量也没有限制。所做的工作达到了奖牌标准并得到了评审委员认可的队伍，都可以获得相应的金、银或铜奖牌。

A. 铜牌

铜牌是 iGEM 比赛的末等奖，也是最容易取得的奖项。获得铜牌需要满足以下全部六个要求：

1. 注册队伍；
2. 完成并递交评审表格；
3. 制作 iGEM 网页来展示团队项目，使用标准生物模块；
4. 在 iGEM 比赛（Giant Jamboree）中通过海报和演讲来展示项目；



5. 制作关于明确团队项目各方面贡献的网页，明确指出学生完成的工作，区分出他人（比如实验室、顾问、指导、赞助商、专业网页设计师、艺术家以及商业服务等）的工作；

6. 至少记录一个关于你项目核心的新的标准生物模块或者装置，并将其提交到注册数据库中（提交需符合 iGEM 注册指南）。也可以记录往年 iGEM 模块的新应用，将文件添加到模块主页。

B. 银牌

在铜牌要求的基础上，还需满足下面全部三个要求：

1. 实验验证至少一个你设计并构建的新模块是可以工作的，在主页注册表记录该模块/装置的代表。这一工作模块必须与记录到铜奖标准里的模块不同；

2. 向 iGEM 注册中心提交这个新的模块（提交方式依据注册指南）；

3. iGEM 在实验室之外涉及到的重要问题，如可持续发展等的 human practice。



C. 金牌

在铜牌及银牌要求的基础上，满足下面两项或两项以上要求：

1. 二选一：（1）展示你如何将调查的问题整合进你的项目的设计与执行，从而进一步丰富银奖 human practice 的内容；（2）展示一种关于项目的创新实践活动（比如关于教育，公众参与，公众认知等）；



2. 帮助来自高中、其他分组、其他大学或研究机构的 iGEM 注册队伍。例如，辅导新队伍，表征模块，调试构建（的想法），建模/模拟系统或者验证解决合成生物学问题的软件硬件等；

3. 改进原有模块或装置的功能或者表征方法（由另一只队伍构建或者本队伍往年构建），在注册中加入该信息；

4. 展示你项目的功能原型。你的原型可以来自之前的项目或其他队伍的项目（未被证明能正常工作的）。展示这个系统在实验室模拟的真实条件下可以工作。

2) 组别奖

每个 iGEM 队伍最终都会被分到一个分组中进行比赛，各个分组也会评选出组内的最佳项目。以 2015 年为例，有如下奖项：最佳能源规划项目、最佳环境项目、最佳食品及营养项目、最佳基础研究项目、最佳药物及健康项目、最佳信息处理项目、最佳制造业应用项目、最佳新应用项目等。

除了传统的分组奖项外，2015 年组委会还新设立了几个特殊分组，以下是这些新分组的奖项：最佳艺术设计项目、最佳实验室优化项目、最佳硬件项目、最佳高中队项目、最佳测量项目、最佳政策与实践项目、最佳软件项目等。

3) 特别奖

在 iGEM 中有着特殊的贡献的人将获得 iGEM 的特殊奖励。以 2015 年为例，有如下奖项：最佳综合 Human Practice 奖、最佳教育及公共参与奖、最佳创新测量奖、最佳建模奖、最佳新基础模块奖、最佳复合模块奖、最佳模块集合奖、最佳 wiki、最佳海报、最佳展示、最佳软件工具奖、最佳企业支持奖、最佳应用设计奖。

4) 决赛入围队

少数 iGEM 队伍将会因为他们整体项目的优点被评委挑选出来作为决赛入围队（iGEM Finalists）。这些队伍将有机会在所有队伍面前展示他们的项目。并且决出最终本科和研究生组的前三名（Grand Prize、First Runner-Up、Second Runner-Up）。

5. iGEM 能给我什么

iGEM 和我们所谓的学科竞赛并不太相同。它所涉及的合成生物学这一前沿学科是我们大部分本科生，即使是生命科学专业的同学，也没有系统学习过的。iGEM 实际上也是教育的一种形式，我们称之为研究性教育（Research Based Education）。

当然这和“大创”“挑战杯”一类的比赛又有不同。严格的规则和设计精当的评奖程序让我们实打实地投入到一个实际的科研项目当中。面对一个未知的课题，以“探索”的心态真真切切地参与查阅大量文献、选题、设计实验、实验、分析数据、探讨如何解决研究瓶颈、调查研究结果如何投入实际应用、与他人交流项目、展示自己的研究成果等等一系列在完整的科研过程中需要经历的每一步。而从这一步步当中获取的实战经验，远远比专业课上我们的授课型教育能给我们带来的更为丰富、更有意义。

参加 iGEM 的同学将来有很大部分其实都不会从事合成生物学的科研工作。但是如何精确查找文献、如何高效阅读文献、如何形成一个科研项目的思路、如何有条理地表达展示科研过程及成果等等，这些都是你将获得的共通的技能。

或许你毕业后甚至不会从事科研工作。但从更加广义的一个层面上说，这几个月的参赛经历和团队生活，也会锻炼你与人沟通、科学分配任务、科学安排时间、表达展示、英语读写等等能力。还有不得不提的，你将获得和你一起为了同一个热爱的目标并肩奋斗的小伙伴们！更多的，要等你真正参与其中，来自己品味和自己探索。

此外，当然会有一份别样的成就感。因为 iGEM 将让我们每个人都参与到合成生物学这一前沿学科的发展和推进当中。我们将自己设计的生物系统或模块注册在数据库中，成为新的标准模块，供全球的科学家共享。这让我们作为学生的创新成果，拥有了更为深远的学术价值和潜在应

用价值。

大学里，有些人没拿奖却学会了如何组建团队、如何团结队友、如何提高凝聚力；有些人拿了奖也无非只是多了一张证书，多了一些荣誉，多一个保研的机会，让他上台去讲他讲不出什么实际的东西。真正有用的东西是那些真的积累，是你苦思冥想的创新精神、是你寒暑不辍的意志培养，是你代代传承的人脉积累，是你们永不放弃的患难与共！

二、 iGEM 建队指南

1. 队伍的概念

一支队伍需要付队伍的注册费，需要在聚会的时候进行一次展示，制作一张海报，可以获得一系列奖励。几个学校可以联合成一个队伍，一个学校也可以出几只队伍，特别是学校有一个实验队（我们通常称之为“湿队”）和一个软件队（我们通常称之为“干队”）是很正常的。



2. 招募成员

出于公平的考虑，iGEM 对他们的参赛者也有着严格的要求：iGEM 团队必须隶属于某一大学或学院；团队中所有成员年龄必须在 23 岁以下，博士研究生可以充当大学生队伍中的顾问；一支团队至少要有 2 位导师指导，其中至少一位须是大学教职人员。

要组建一支 iGEM，首先需要寻找队员和导师。你可以通过宣传从生物学、生物工程、化学、化学工程亦或其它任何专业需找队友，或是联系学校的有关单位招募那些寻找暑假实习机会的学生。iGEM 对团队成员人数并无限制，但推荐 8-15 名来自不同专业，拥有不同实验经历的学生组成团队。队员可以寻找自己专业的教授或是学院的院长作为导师。另外，iGEM 允许团队成员来自不同学校，所以你可以加入邻校的 iGEM 团队，亦

或是向邻校招募队员。在附 1 中，我们给出了北京化工大学 2015 iGEM 招募队员的项目，仅供参考。

需要提醒的一点是，iGEM 项目会占有大量的时间，iGEM 成员应确保自己能够腾出自己在春季学期的空余时间以及整个暑假来参与到团队中。

3. 资金准备

首先我们要知道参加 iGEM 比赛需要多少预算，以 2015 年为例，我们的每支队伍需要在 4 月 15 日之前交纳 4000 美元作为注册费，若延期需要多交 500 美元，5 月 1 日为最后期限。（每年的时间和金额可能会有变动）个人注册费用为 695 美金/本科生，695 美金/导师，750 美金/其他人员。再加机票住宿约 15000 人民币/人

若参加地区大赛及总决赛，团队中去参加的人需额外交注册费。（每年的时间和金额可能会有变动）。

既然我们知道了 iGEM 团队需要大量的资金支持实验、注册、参加地区大赛和总决赛，你可以寻求学校或者学院的帮助，并可以向当地的企业和其它机构寻求赞助。在学校寻找空余的实验室以支持团队假期的实验和会议，最好能够长期预订一个实验室供以后的 iGEM 团队使用。

4. 知识与技能的培训与考核

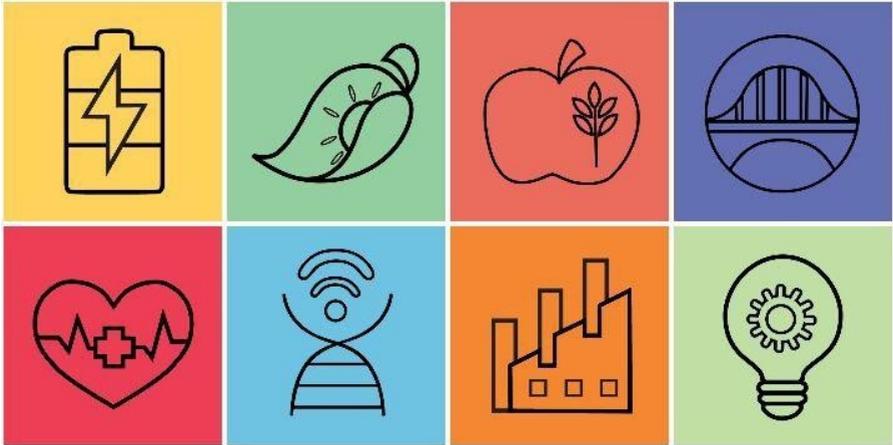
队员们来自各个专业、各个年级，对 iGEM 和合成生物学的认识也会是参差不齐。在队伍正式开始定题工作之前，对队员知识与技能的培训与考核是必不可少的。

以天津大学为例，我们往往在寒假前进行宣讲、招募和面试，在寒假

安排一些阅读文献和分析往届队伍 wiki 的任务。开学 2 个月左右以每周 2 次的频率让每名队员展示讲解自己分配到的 wiki 或文献，并进行提问和讨论。2 个月后到暑假前以每周 1 次的频率进行分组介绍选题及分析可行性。在这两个过程中同时进行队员的评估与淘汰。暑假则正式定题并进入实验。

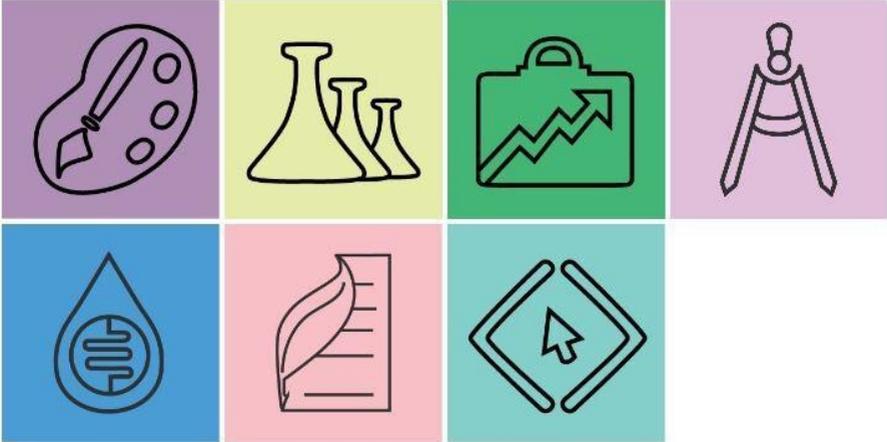
在附件 2-5 中，我们给出了专业知识、培训课程、举例、参考资料和培训测试的举例，仅供参考。

5. 选定题目



由于 iGEM 大赛没有对各团队的项目内容做出限定，所以项目开始前需要做的定题工作。通常的做法是，团队成员先进行头脑风暴，讨论生物工程在“新的应用、食物、能源、基础性的进步、健康/医学、环境、制造、测量、信息处理、软件工具”这几个方向中所可能产生的应用，确定几个备选方向。再分组分别在这些方向上收集资料和文献支持，设计生物系统。各小组之间定期交流，从而在暑假前确定基本方案。需要指出的是，由于

有机体的复杂性以及实验结果的不可预知性，最终的参赛方案可能会与当初的设计有较大差异，方案的设计工作应该贯穿于整个实验阶段。



三、 优秀队伍项目展示

1. 2014 年帝国理工学院 Aqualose 项目

1) 概述

随着人口的增长，城市发展与现代化带来日益严重的水资源危机。由于水危机会造成世界各地社会动荡，因此急需有效的水处理系统，以满足要求，而废水回收作为一种行之有效的解决方案为世界各国高度重视，但其中存在的技术与社会障碍仍然亟待解决。所以，我们迫切地需要建立一种新的低成本的有效的废水回收方法。

纤维素是自然界最丰富的有机聚合物，因具有很多优良的性能而被广泛



Aqualose

地应用于医药行业以及纺织业，我们常用的纤维素都是来自植物中的不纯纤维素，而细菌产纤维素纯度高且生产过程少。

本项目主要包括工程化 *Gluconacetobacter xylinus* 以提高细菌纤维素的产量，将细菌纤维素合成系统转移到 E.coli，通过与重金属吸附蛋白结合来功能化细菌纤维素使其应用于水过滤，制备水超滤膜，除去水中的重金属污染物，达到净化水的作用。

2) 项目内容

A. *G.xylinus* 的工程化

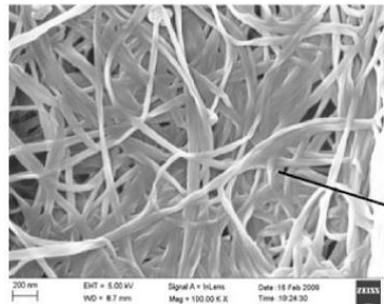
团队从红茶菌中筛出一株 *gluconacetobacter* 命名为 *G.xylinus* IGEM。首先测定了 *G.xylinus*T53582 和 IGEM 的性能（包括 HS 培养基葡萄糖及不同碳源影响纤维素产量、抗生素敏感性）。由于新一代测序价钱昂贵，团队通过构建基因组 DNA 文库来 *G.xylinus*T53582 和 IGEM 进行测序，这是 IGEM 史上第一次自主测序。之后，将两株菌及基因组的全部信息提交到模块库。

此外，团队还针对 *G.xylinus* 遗传操作方法缺失而创建了一套遗传学系统工具来工程化 *G.xylinus*。发现 4 种可以在 *G.xylinus* 及 *E.coli* 中自主复制的质粒；通过不同 Anderson-RFP 载体的表达水平判断 Anderson 启动子的强度；通过 *vbh* 基因在不同强度 Anderson 启动子表达探究该基因功能，发现该基因能够提高纤维素产量。

B. 在 *E.coli* 中构建细菌纤维素合成系统

首先选取纤维素生产最佳模块，考虑到 *acsAB* 与 *acsC*、*acsD* 在原始菌中表达水平不同，选用两个启动子强度以及拷贝数不同的载体，构建了两个表达载体，（同时减小了较大载体对细胞生长和质粒增殖的负担）。

将两个载体转化到工程菌 *E.coli* DH10B 中。通过刚果红与纤维素结合作用可以指示是否有纤维素生成，验证构建的工程菌是否具有完整的生产纤维素的功能，



并通过对照实验研究发现只含 *acsAB* 的载体可产纤维素，但不能排出。

C. *G.xylinus* 与 RFP-*E.coli* 混合培养

E.coli 约 30min 增殖一代，*G.xylinus* 在酵母存在条件下具有很强的纤维素合成能力。因此，团队希望可以通过 *E.coli* 生产一些特殊蛋白（如可以与金属结合的植物螯合肽）与 CBD（纤维素结合域）融合，同时 *G.xylinus* 生产纤维素与其结合，即完成功能化第一步。

产纤维素的 *G.xylinus* 和产蛋白的 *E.coli* 在混合培养中因营养成分和生存空间有限，可能会存在竞争关系。为了有一个比较稳定的混合培养环境，团队通过 *G.xylinus* 与 RFP-*E.coli* 混合培养优化 HS 培养基，确定最佳碳源。此外，纤维素产量可以判断 *G.xylinus* 的生物量，其中纤维素中红色深浅可以指示 *E.coli*。

D. 纤维素功能化

功能性蛋白与纤维素结合，可以用来选择性除去水中的主要污染物。通过 sfGFP、重金属结合蛋白以及 5 种不同的 CBD（纤维素结合域）融合（其中三种新的 CBD 提交到模块库），团队通过定性 CBD 间相互关系，证实可以应用于除去水中污染物。

将 sfGFP 作为筛选标记，首先与 CBD 连接，之后与目的重金属结合蛋白融合，形成 sfGFP-CBD 融合蛋白。测试并验证 CBD 与 sfGFP-CBD fusion proteins 的结合强度。

E. 量产纤维素

这里，团队生产了大量的细菌纤维素，用于制备水超滤膜，成为 iGEM 历史上材料生产量最多的队伍，团队尝试用不同的溶液处理细菌纤维素以用于纺织行业皮革制品。在测 BC 产量时，考虑 BC 与表面的黏附性，并去除有害物质降低其危害。（右图为团队获得的纤维素，又经染色）



F. 纤维素性能测定

通过测试 BC 的机械性能，验证细菌纤维素作为水滤膜的可行性。测试滤膜的拉伸强度，及其计算在使用中产生的剪切力，与以往的水超滤膜对比，用细菌纤维素制作的滤膜更加柔软，可以承受更大的水压，且无杂质的纤维素制备的水膜并适于长期使用。

G. 项目分析

本项目主要通过功能化 BC 来过滤废水除去水中的重金属离子。首先通过在 *E.coli* 中构建 *acs* 操纵子，表达纤维素合成系统，构建了 *G.xylinus* 基因操作工具，通过混合培养进行功能化第一步，协调 *E.coli* 和 *G.xylinus* 的竞争关系，之后通过 sfGFP 与重金属结合蛋白融合蛋白，进一步功能化纤维素，制作水超滤膜，并通过实验验证其可行性以及重金属吸附性能。理论与实际结合，解决水能源危机问题，并且还可以进一步推广至处理水华。而且团队构建了很多模块并提交，对以后 iGEM 队伍的相关研究有很大帮助。

2. 2014 年国立交通大学 Operation Debug 项目

1) 实验背景

长期以来，害虫一直严重影响人们的日常生活，但却一直没有合适的方法处理，每年害虫都会导致农业方面的巨大经济损失。

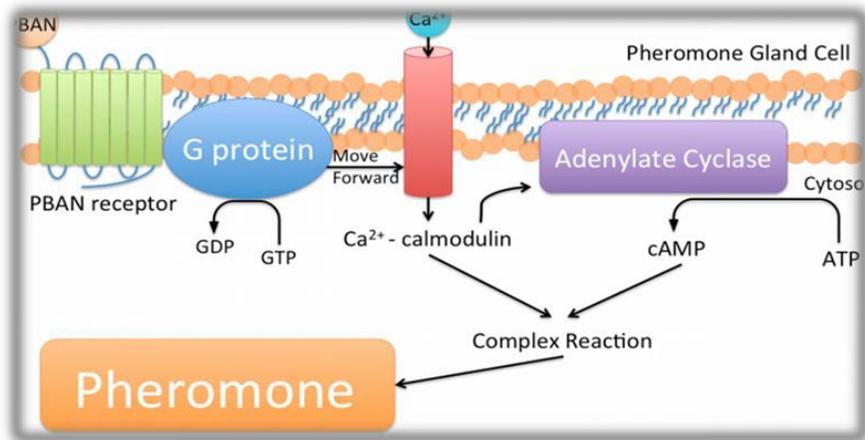
以巴西为例，每年由于严重的虫灾导致可可豆，咖啡以及甘蔗减产造成的损失约达 110 亿美元，为此每年花费 14 亿用于购买杀虫剂。巴西只是世界众多虫害案例中的一例。为保障产量，人们通常采用以下方法：

(1) 化学途径即杀虫剂，但杀虫剂中，杀虫剂中含有的有毒物质不仅对环境有害，对人类健康也极为不利。

(2) 利用生物途径，如苏云金芽孢杆菌，其产生的晶体蛋白对昆虫有毒害作用，但有研究表明越来越多的昆虫对这些蛋白产生抗性。

因此，团队决定构建一种信息素陷阱，特异性吸引昆虫并将其杀死。由于生物合成信息素的复杂性，我们选择通过表达信息素合成激活肽 PBAN。PBAN 与信息素一样，都具有种类特异性。当一种特定的 PBAN 与目标种类的昆虫接触时，就会刺激特定的信息素并释放来吸引更多的昆虫。团队成功地在 E.coli 中构建并表达了九种不同种类昆虫的 PBAN，还制作了昆虫捕捉装置。

2) 项目内容



上图为信息素合成途径，一旦 PBAN 与受体结合，就会刺激生物体产生信息素。

在利用 PBAN 前，团队需要判断：

(1) 外源 PBAN 是否能被昆虫吸收并利用。团队采用不同浓度 PBAN 注射到棉铃虫体内，测量其信息素产量。结果表明昆虫可以吸收并利用外源 PBAN。

(2) PBAN 在昆虫体内会快速降解。团队决定用高浓度 PBAN 持续喂食飞蛾，持续补充飞蛾体内 PBAN 的含量，来解决 PBAN 不能再飞蛾体内长时间保持的问题。

A. 构建 PBAN 表达载体并在 E.coli 中表达

团队首先确定了 9 种 PBAN，在 NCBI 上查找其序列，为了使 PBAN 在 E.coli 中更好的表达，团队对全部密码子进行了优化，以确定最佳序列。在载体上优化后的序列之前加上 IGEM 标准模块，构建表达载体，通过 PCR 验证目的片段大小，实验证明 PBAN 序列已经成功连接到理想的骨架上。之后通过 SDS 蛋白凝胶电泳确定 E.coli 中 PBAN 是否表达并产生蛋白，



最终证明重组 E.coli 可以生产 PBAN。团队还进行了一个蓝色荧光实验以预测 E.coli 中 PBAN 的表达水平，结果发现不同种类的 PBAN 表达水平不同，推测可能是由于其密码子不同。

B. 昆虫测试：PBAN 影响实验，昆虫行为实验以及装置测试

团队制作了一个包含合适的光和营养源的装置来吸引昆虫。只要有虫子被吸引到装置中，就必然会接触到 PBAN，然后激活信息素的合成来吸引更多的同种类昆虫。由于信息素的种类特异性，即使有别的种类的昆虫被吸引到装置并接触到 PBAN，也不会产生信息素。就是说，我们的装置只会抓我们需要捕捉的昆虫，不会影响其他种类的昆虫。

图为实验装置：



3) 项目分析

该团队利用无污染，害虫无抗性的信息素作为介质来吸引昆虫，并将其杀死，对环境和人类都没有造成危害，立意很好，而且由于化学合成及生物合成信息素的复杂性及经济效益，选择了构建 PBAN 表达载体，很有意义，为使模块更好的表达，他们还对每一个密码子进行了优化。

而且该团队不是仅仅做一个猜想，他们利用实验成果制作了实物装置，且经证明其有效。这对解决实际问题有很重要的意义。该团队的 wiki 特意在文中显著标明关键字，对看的人来说很方便理解其大意。

3. 2014 年海德堡大学 The Ring of Fire 项目

1) 项目背景

多数蛋白中都存在内含肽，但对其的了解并不完全，科学家至今不清楚内含肽在宿主蛋白质中原初功能。

内含肽作为外源多肽序列整合到普通蛋白质中，它们对蛋白质的功能没有影响，但会在翻译后自催化拼接反应。如同 RNA 水平的内拼接，这种转录后修饰称为蛋白质拼接。最终形成的蛋白质叫做内含肽 intein，即“internal protein sequence”，侧翼蛋白链外显肽 extein，即“external protein sequence”。内含肽可以消化自身从宿主蛋白脱落，重新生成肽键连接 C 末端和 N 末端，回复自身的功能和结构。

2) 项目内容

A. 溶菌酶

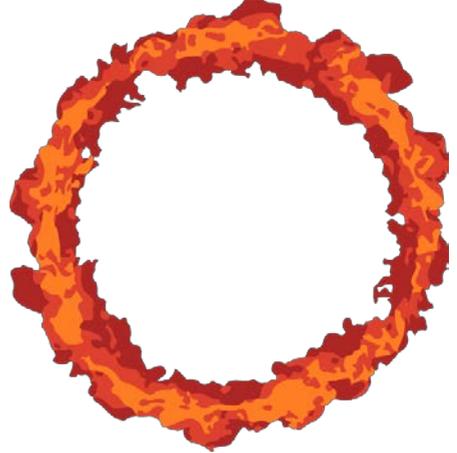
为了不破坏蛋白质结构，团队构建了一个 CRAUT 模型，作为一个综合软件设计 linker，在保持蛋白质结构与功能的前提下，确定最佳末端连接方式来环化蛋白质。以 λ 溶菌酶为例进行环化，测定其环化前后不同温度下的酶活，并根据实验结果来校正软件。

实验部分目的包括：1.测试推论的可行性，

带角度的刚性 linker 是否可以赋予蛋白质热稳定性，且其是否比柔韧 linker 更有效。2.测试基于 linker 的稳定性是否可以校正该软件，将测试的 linker 分为优、良、中、差、不合格，并通过酶活选择最佳 linker。

选择溶菌酶的原因：晶体结构完整，末端距离 27.3Å，且易于获得可以从 λ 噬菌体基因组中克隆，并在 E.coli 中表达；利用底物测试溶菌酶酶活的方法已工业化。

通过克隆及表达与不同 linker 融合的溶菌酶基因，团队利用冻干菌体做底物测试酶活，并且建立了热刺激试验检测酶的热稳定性。



团队构建了线性溶菌酶与不同 linker 的融合构建载体，及基于 NpuDnaE intein RFC(105)环状溶菌酶与不同 linker 融合的环状表达载体，用 western blot 和凝胶电泳来验证环状蛋白与线性蛋白。

B. 环化甲基转移酶

团队希望构建一种耐热的 DNA 甲基转移酶用于 PCR 来将原始 DNA 的甲基化状态转移到产品。由于 DNA 甲基化在基因表达调控的重要作用，这将会是表观遗传学的一大进步。实际上，团队决定环化 DNA 甲基转移酶。DNM1 和辅助因子 SAM 可以加入常规 PCR，那么 DNA 扩增就可以不用去甲基化。团队决定通过环化 DNMT1 来提高其热稳定性。

利用标准化克隆程序来表达环状蛋白。部分构建基于 intein Npu DnaE 和 sortase A，在蛋白质环化过程中通过 GOLDEN GATE 克隆的 mRFP

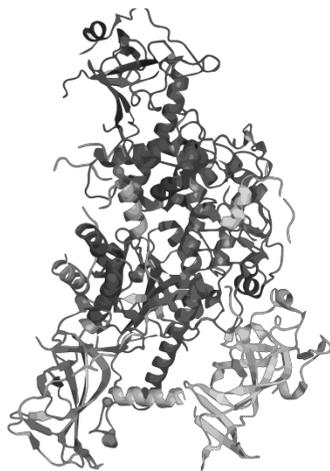
筛选标记会很快被替换。而利用内含肽自剪接进行环化则会使带 C-intein 的蛋白产生 N-intein。表达后，内含肽会自己脱落并在原来的地方产生肽键来环化蛋白。最终表达蛋白必须在体外进行 TEV 蛋白酶和 SortaseA 处理纯化，采用 GFP 来测试内含肽和 sortase 的环化。

由于 DMNT1 末端距离太远，需要在中间利用 linker 连接，据文献报道一般用柔韧 linker，团队推断刚性 linker 也可以用于连接末端，且可能效果更好，故建立模型 CRAUT，并利用溶菌酶为例验证。

基于 RFC 标准程序构建载体，分别用柔韧 linker，刚性 linker 连接，在 E.coli 中表达之后利用甲基化敏感酶 Sau3AI 和 HpaII 来测定酶活，这主要是依赖于甲基化基团与切割位点靠近时限制性酶的一致作用。通过 SDS 凝胶电泳观察是否有蛋白质表达，测定 PCR 相关温度刺激下环化前后以及柔性刚性 linker 连接 DMNT1 的活力。

C. 木聚糖酶

工业用酶一般都需要耐高温。选择枯草中的木聚糖酶主要是由于其工业用潜力大，且 C、N 末端距离近易于环化。分别构建木聚糖酶的以下载体 Linear、Linear+His、Linear+His+Ext 以及 Circular、Circular+His、Circular+His+destr.Ext.测定环化前后木聚糖酶的酶活。



3) 总结

海德堡大学用合成生物学的方法来环化蛋白质从而提高蛋白质的温度及 PH 稳定性以及对外肽酶的抗性。为了验

证理论的可行性，团队以 3 种常用蛋白质为例，对比其环化前后的性质，这三种蛋白分别为溶菌酶，B.subtilis 产的木聚糖酶，DNA 甲基转移酶 DNMT1。为了在体外环化蛋白质，团队选择利用内含肽，因为内含肽可以在翻译后通过自剪接作用调整蛋白质。之前也有队伍用到过内含肽，但没有利用其环化蛋白的先例。在他们的 wiki 中，他们阐述了蛋白质环化的基本原理，以及兴趣蛋白质的环化方法。

某些蛋白质的末端距离太远导致只有一部分残基可以通过内含肽拼接，于是团队思考决定在引入 linker 来进行环化。据文献报道，只有柔韧的 linker 才可以用于连接相邻的末端。团队推断刚性 linker 比柔韧 linker 具有更强的连接稳定性，因此，团队制作了一个软件 CRAUT 来设计可以赋予目标蛋白三维结构的最佳 linker。以溶菌酶作为模式蛋白，测试软件的预测性，调试最佳 linker 的条件。

用刚性 linker 来环化后的溶菌酶，与线性溶菌酶以及柔韧 linker 环化的溶菌酶相比，具有更好的热稳定性。此外，环化后的木聚糖酶在 63°C 仍保持较强的活性，而线性蛋白已经没有活性。DNMT1 环化后热稳定性也有所提高。



由于 CRAUT 软件的不便，团队决定构建基于 BOINC 的 iGEM@home 平台来分配计算。这是第一次有 iGEM 团队分配计算。

这个项目真的很新颖，利用内含肽来环化蛋白，这是之前没有做过的，用甲基化 PCR、计算分配平台的建立更是从来没有出现过的，所有的 toolbox 在模块库中都是未曾涉及的。该项目展现了惊人的结果，并且在多种环境下都能完成，很多队伍的理论往往仅适用于一种条件下，很少有像本项目一样适用于多种情况，且效果明显。

除去环化系统的设计，团队不仅考虑了模块，还考虑了蛋白的 3D 结构和合适的 linker。团队设计 linker 的模板也很创新，且团队将其发布到网上使其他团队能够使用，扩宽这种提高蛋白稳定性的系统的应用范围。此外，在构建所有内含肽 toolbox 中，海德堡都使用标准化模块化理论。

4. 2010 年华盛顿大学免疫学项目

1) 项目背景

华盛顿大学的 IGEM 团队意识到由于传统抗生素的滥用致使致病菌产生很强的抗药性同时也导致肠道有益菌受到破坏的问题，想到运用合成生物学手段解决这些问题。利用合成生物学的工具，他们设计、建造和测试了两个抗感染的两大类型细菌的新系统——革兰氏阳性和革兰氏阴性系统。第一个项目的目标是炭疽杆菌，它是一种革兰氏阳性病菌，可以引起炭疽。他们重新设计了一种可以清除病原体表面防护外壳的酶，从而使其无力防御免疫系统的攻击；在第二个项目，他们重新设计，并移植了一个能够对抗革兰氏阴性细菌的蛋白质分泌系统进入大肠杆菌。这个系统是一个以革兰氏阴性致病菌为特定目标的可控的新型模型。

2) 革兰氏阴性细菌项目

利用小分子抗生素变得过时了，因为随着时间的流逝，病原体不断进化发展出对现有抗生素的抵抗力。另一个问题是，今天的抗生素是没有区分致病性和非致病性细菌，它们同时杀死了两种细菌。有许多细菌在肠道是有利的：他们帮助身体消化、生产维生素，如维生素 K，依靠竞争生长排除致病入侵者。通过限制剂量有利用减少致病菌发展为更强抗药性的机会，并且也可以减少对有益菌的伤害。这个项目的目标是利用天然细菌武器杀死其他细菌：VI 型分泌系统/毒素注入系统加入到一种益生菌，当有特定

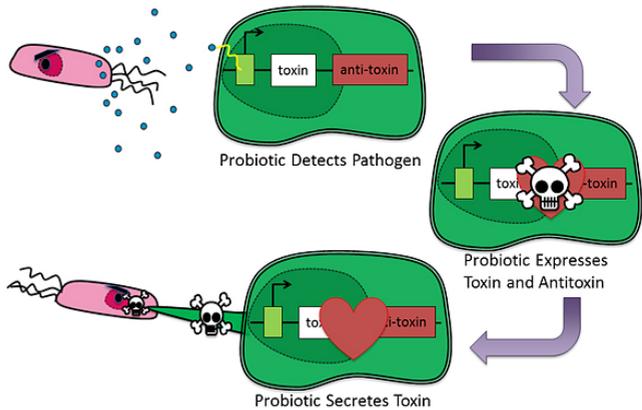
的革兰氏致病菌存在时可以被激活并发挥作用。

A. 第 VI 类分泌系统

Type VI 分泌系统(T6SS)是一种发现在许多革兰氏阴性细菌(如绿脓杆菌)的蛋白质注入机制系统。T6SS 的行为就像一个矛一样刺穿细胞膜。穿刺后,“矛”提供了一个通道,毒素等蛋白质可以进入发到被穿刺了细胞。我们想把这个系统为模型,用它来目标细菌革兰氏阴性细菌。由于 T6SS 无法

刺穿革兰氏阳性细菌或真核细胞的细胞膜,所以华盛顿大学的 iGEM 团队想到用它做模型,用来针对革兰氏阴性细菌进行穿孔,而不会伤害到对人类细胞有用的革兰氏阳性菌。另外大

肠杆菌是一个不包含 T6SS 细菌物种。因为大肠杆菌是服从的遗传变化,并且很容易在实验室里培养,是一种常见的存在于肠道的革兰氏阴性细菌,所以将 T6SS 导入到大肠杆菌很适合。其结构如图。

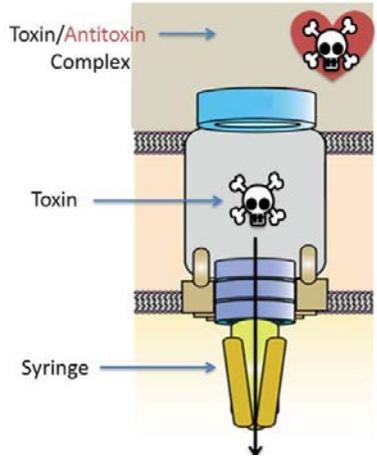


B. 毒素抗毒素系统

在铜绿假单胞菌中, Tse2 是一个由 T6SS 系统分泌到革兰氏阴性细菌的有害蛋白质。当在多种原核和真核细胞内表达时, Tse2 已经被证明可导致细胞死亡。通常情况下, Tse2 和 Tsi2 形成一个复合物, 从而不表现出毒

性。也就是说 Tsi2 是一个和 Tse2 共同表达的蛋白质，可以作为抗毒素存在。

如果将 Tse2 分泌到目标细胞，使两种蛋白质分开，那么 Tse2 可以使靶细胞死亡。通过控制 Tse2 的表达和 Tsi2 的生产并且在有致病菌存在时开启，他们就可以实现对致病菌的专一性选择，而这有助于解决之前提到专一性和细菌抗药性的问题。下图为该系统的示意图。



C. 将 T6SS 基因转移到大肠杆菌中（使用质粒）

T6SS 由分布在不同的几个操纵子上的 23 个基因组成。通过标准的限制消化克隆技术捕捉和移动这些基因被认定是不切实际的。华盛顿大学的 IGEM 团队发现可以使用他们一直在用的 fosmids(实质上是大质粒)解决铜绿假单胞菌菌株(PAO1)的基因问题。因为他们发现一个 fosmids 中包含了所有必要的并且是组织好的 T6SS 基因，只是分布在两个不同的操纵子上。他们将 fosmid 成功地转移到大肠杆菌中，但是还不清楚是否可以在大肠杆菌中表达，因为控制基因 T6SS 表达的启动子来源于铜绿假单胞菌。为了验证 T6SS 基因的表达，他们使用抗体免疫印迹检测分泌系统的一个关键蛋白质 Fha1 的分泌情况

D. 检测 T6SS 在大肠杆菌中的表达

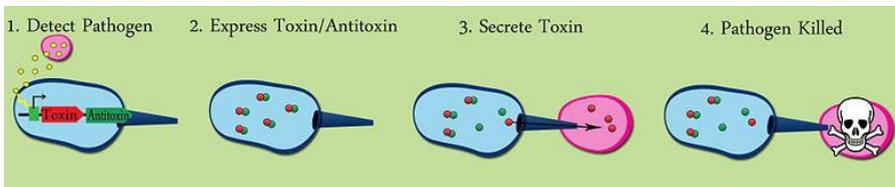
那么如何才能使 T6SS 基因在大肠杆菌中表达呢？他们选择重新设计了一个启动系统，取代原生绿脓杆菌的启动系统。经过论证，他们选择了一个双向 T7 启动子，因为它可以促进 5'和 3'方向的转录，且 T7 研究得很透彻，可以在大肠杆菌中高效表达。

E. 设计毒素/抗毒素系统的调节方式

他们选择从 T6SS 的调节系统中分离出毒素与抗毒素的调节系统 (Tse2.Tsi2)，因为 T6SS 中有很多容易诱导的蛋白质。新型的 Tse2/Tsi2 生成调节回路的目的是只在必要的时候激活阻遏机制使大肠杆菌产生的抗生素失活。如果生产 Tse2 益生菌系统按照既定的形式分泌产生抗生素，将影响天然肠道菌群的生长。此外，天然肠道菌群可能产生对 Tse2 的耐药性并传递给潜在的革兰氏阴性细菌。基于这个项目的目的，他们决定改造出一种只有在检测到特定的致病菌时才表达出 Tse2 毒素，并且可以在同一个操纵子上表达出 Tsi2 的有益菌。

F. 在检测到病原体时诱导毒素基因表达:概念证明

为了激活 Tse2 基因的表达以回应一种病原体，他们需要一种可以特殊识别致病菌分子的启动子，同时同样的刺激信号也可以使 Tsi2 基因表达。作为一个概念验证，这个项目使用弧菌 *Vibrio fischeri* 中的 LuxR-pLux 转录因子-启动系统来调节 Tse2-Tsi2 表达途径。pLux 启动子的表达与与



细胞密度相关，这被称为群体感应。同样的道理，当改造后的的益生菌检测到一个革兰氏阴性病原菌的特定分子(由高速逻辑建模)时，可以导致 Tse2 基因(一种有毒蛋白)和 Tsi2 基因的表达(抗毒素)。接着 T6SS 攻击病原体，刺穿其细胞壁，并将 Tse2 分泌到革兰氏阴性病菌中，杀死病原体。

G. 实验结果验证

为了确认拥有重组启动系统的 T6SS 可以在大肠杆菌中表达，他们将重组的 fosmid 转入一个在有 IPTG 存在时可以产生 T7RNA 聚合酶的 T7 表达菌株。然后对细胞提取物进行免疫印迹实验，检测 Fha1 的存在，以此来验证 T6SS 表达的蛋白质是否存在。在诱导的条件下 Fha1 蛋白得到了表达，而不是在非诱导条件下。这表明重组质粒的成功以及在 T6SS 蛋白在大肠杆菌系统中得到了表达。

3) 新型炭疽热治疗方案

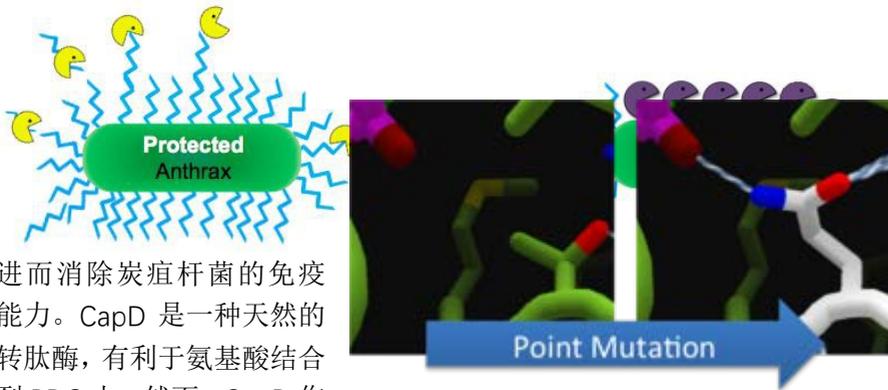
炭疽热是一种由炭疽杆菌感染导致的致命的疾病，它可以通过摄取、吸入或皮肤接触孢子进行传播。这个病是不会传染的，不能从一个受感染的生物转移。其致命性的最主要的原因之一是致命炭疽杆菌病原体能够逃避人体免疫系统的识别与抵抗。细菌使自己包裹一个 poly- γ -D-glutamate(PDG)，使自己拥有抗吞噬的能力。毒性保护 PDG 外壳由炭疽杆菌的一系列酶合成而成，其中关键的一步

通过 CapD 酶，将 PDG 长链的部分输送到细胞外，并且通过转肽作用加入到肽聚糖层中去。在整个过程中，CapD 也有能力催化水解 PDG，但是速度要比竞争转肽作用反应慢得多。因此，华盛顿大学的 IGEM 团队希望制作出变异的 CapD 蛋白有倾向性地使转肽作用反应降低，同时水解外衣的反应加强。换句话说，如果可以得到一个编码水解反应的 CapD 酶的

变异基因（没有转肽作用），那么给感染的个体打一剂量就可以治疗了。

A. 炭疽杆菌潜在的武器——CapD

目前基于豚鼠模型的研究显示 CapD 的过量表达会破坏细菌的外壳，



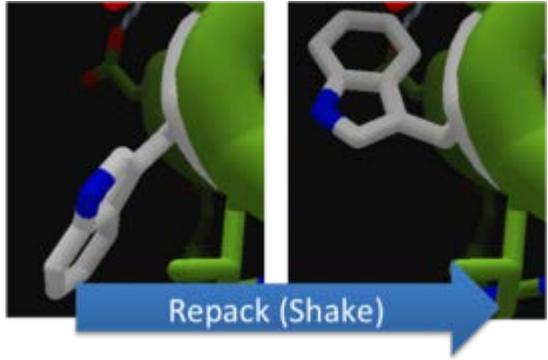
进而消除炭疽杆菌的免疫能力。CapD 是一种天然的转肽酶，有利于氨基酸结合到 PDG 上。然而，CapD 作

为一种水解酶，可以有效地与水反应，因为人的血液中含水量很高。如果一个突变的 CapD 可以改造为一种极其有效的水解酶，那么就可以在血液中使用使入侵的炭疽杆菌数量降低，失去致病能力。

B. 使用 FoldIt 使 CapD_CP 成为一种更好地水解酶（突变）

第一种类型的突变是通过降低活化能增加水解能力。为此，他们创造了可以通过生成氢键与底物的过渡状态相连的点突变。第二类型的突变与活性位点的开放性和极性有关。为了实现这一点，他们将活性位点变异成一个更加开放以及极性更加强的位点，所以水分子可以进入使水解反应更加容易进行。

在这些突变过程中，他们使用了一个叫 FoldIt 的计算机程序预测蛋白质结构和组成的变化对蛋白质稳定性的影响。FoldIt 提供了一个可以操作的 3D 蛋白质晶体结构图像。操作功能包括点突变、插入、删除，重新包装侧链(旋转异构体优化)，骨干运动，然后 FoldIt 会评估蛋白质的稳定性。



4) 项目分析

这是一个免疫学项目，感觉很有新意：两种不同致病菌的治疗方案来源于不同的思路。总的来说，他们借鉴了很多之前 iGEM 团队的经验，原理也很简单，如他们在革兰氏阴性菌的项目中也用到了毒素与抗毒素系统。他们创造的有特异性的蛋白质转移系统是一大亮点，在以后的项目中完全可以借鉴。在这里我想到一个环保的项目，就是之前提到的水污染的项目：如何杀死蓝细菌？感觉完全可以借助这一系统来实现对革兰氏阴性的蓝细菌的专一性杀死。

四、 附录

1. 招募队员举例——北京化工大学 2015

A. 湿实验/实验室实验

分子克隆实验，蛋白纯化、检测等实验（对微生物学和分子生物学有一定的了解）

B. 干实验/计算模拟

用于对实验进行预测与指导的数学模型构建；实验数据处理、分析；相关配套软件开发与优化

C. 宣传&社会实践

宣传与普及 iGEM 和合成生物学相关知识，宣传普及项目成果；Human Practice（Outreach & 宣传活动）策划，队伍之间交流、沟通，到相关单位进行社会实践；网络 Contact 负责人：管理人人、微博、facebook、twitter 等

D. 美工设计

海报、队服、队伍 logo 等的设计；官方网站 wiki 的设计；PPT 设计

（熟练掌握相关软件，例如：Photoshop，会声会影等）

E. 网站建设

需要掌握一定的计算机知识，对 HTML、CSS、JavaScript 等有一定的了解，熟练运用建设网站的工具（例如：Dreamweaver 等）

F. 仪器构建

根据实验的需求，构建相关检测仪器与设备（例如：GFP,RFP 等荧光强度的检测）

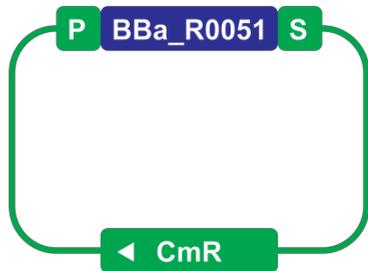
G. 外联

同外界建立合作与争取资源，为本队伍筹集开支费用等

2. 专业知识举例——生物模块

生物模块是指一段具有特定功能的 DNA 序列，例如启动子；编码蛋白的序列。一个基本的生物模块通常是不可再进行分割的。基本生物模块可以被用来组装成更复杂的模块，并在活细胞中表达和操纵。iGEM 比赛就是以生物模块的构建为依托，鼓励更多的大学生点燃对工程菌构建的兴趣。

iGEM 大赛所依托的 registry of standard biological parts 网站是一个标准化的生物模块数据库，由 iGEM 基金会运转。iGEM 团队的项目构建基于这个数据库，同时各队也会递交自己的模块扩充这个数据库。Registry of standard biological parts 拥有所有模块的样品。



利用这个数据库中的模块可自组装成在生物体内具有完整功能的装置，例如 BBa_I763007 是一个可以令细胞表达红色荧光蛋白的报告装置，其由 BBa_R0051(一个基于噬菌体 lambda 基因上的启动子)——和 BBa_I13507 (一个用于荧光报告的中间体) 组装成。

Registry of standard biological parts 中的模块是相互之间可以组装的，为此，其结构必须符合组装标准。例如其内部不能有 prefix 和 suffix 的酶切位点。模块通过其两端 prefix 和 suffix 的酶切位点连接在质粒骨架上。

3. 培训课程举例——北大 2015 前期培训安排

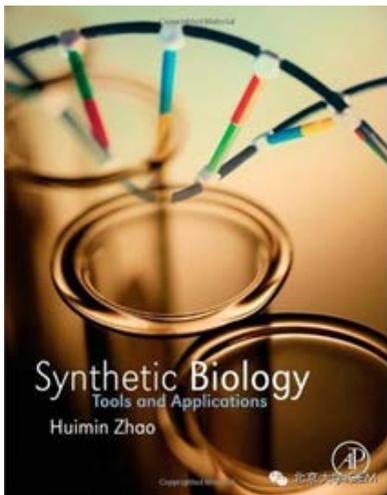
培训时间：2015 年 1 月 18 日-24 日（7 天）每天上午 9:00-12:00

培训内容：

（见下表）

| 时间 | 主题 | 内容要点 |
|---------|--|-------------------------------------|
| 18 日 | Molecular Cloning and Gene Analysis of Prokaryotes | 原核基因组；基因克隆载体；基因组组装方法；以 DNA 操作为基础的应用 |
| 19 日 | Transcription regulation of Prokaryotes | 转录过程与转录相关的基因；元件；转录调控；以 RNA 操作为基础的应用 |
| 20 日 | Population Behavior | 群体感应；抗药细菌；群体进化 |
| 21 日 | Introduction to Modeling | 建模基础；网络建模；蛋白模拟（选讲） |
| 22 日 | Some Important Proteins | 翻译调控；荧光蛋白；转录因子；工具酶 |
| 23 日 | Principles of Genetic Circuit Programming | |
| 24 日 | Learning Methods | 文献检索技巧与方法；iGEM 网站使用；学员分组；培训结果小测验 |

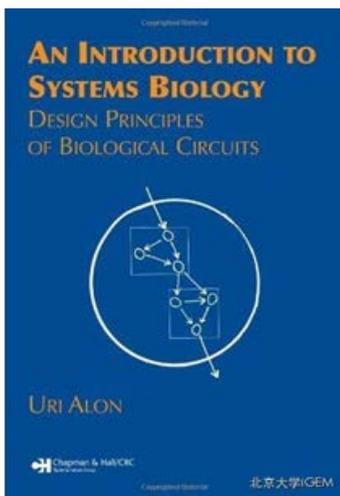
4. 教材和参考资料——北京大学 iGEM



Synthetic Biology—Tools and Application

本书是较新的 Synthetic Biology 启蒙教材，建议初步接触的同学都认真学习。

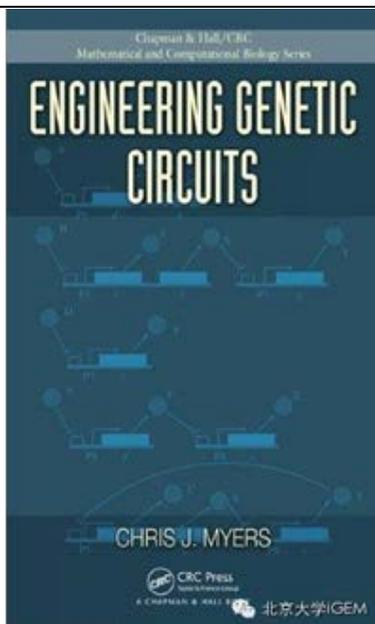
推荐指数：5



An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits

系统与合成生物学启示录级别的教材，感兴趣的同学可进行阅读，本书的内容相当具有启发性。

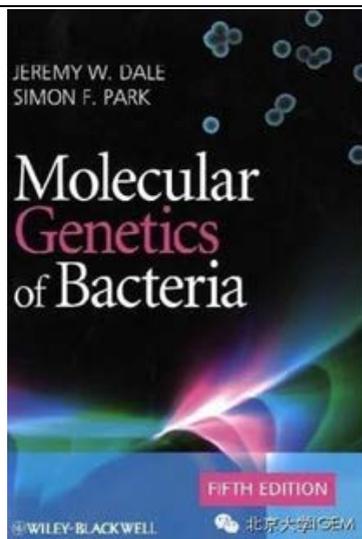
推荐指数：5



Engineering Genetic Circuits

本书是较经典的基因线路设计教材，里面涉及很多模型的知识。能给对线路设计感兴趣的同学提供基本的指导。

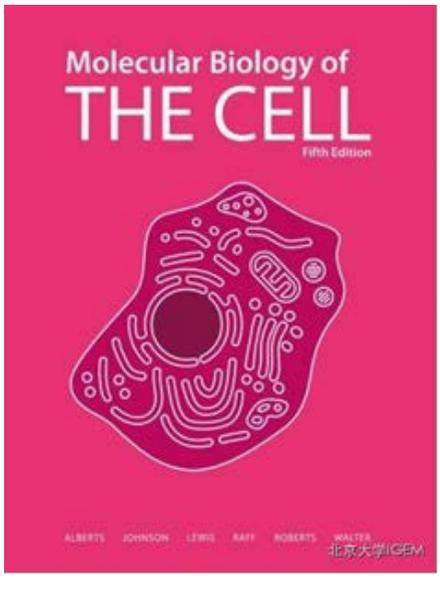
推荐指数：4



Molecular Genetics of Bacteria

原核分子生物学教程，对分子生物学没有基础的同学可先参考本书进行学习。

推荐指数：3.5

| | |
|---|---|
|  | <p>Molecular Biology of the Cell</p> <p>分子生物学圣经，非常值得细细研读的一本教材。本书内容非常丰富，同学们可以选择性进行学习。</p> <p>推荐指数：5</p> |
|---|---|

5. 考核形式参考——2013 复旦培训理论测试

A. 湿实验

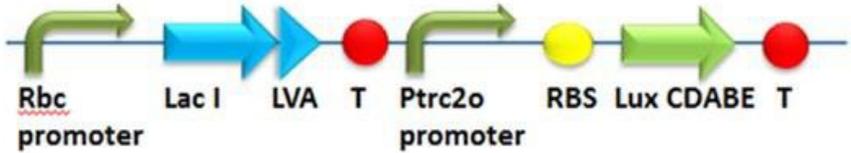
1. 文献检索与快速阅读分析：

请搜索一个具有蛋白浓度、活性、磷酸化水平等进行周期性振荡的网络回路，简明地阐述其回路中的各个组分、生化原理，你的搜索流程。并附上参考文献。

2. 实验设计：

请为合成如下一段序列设计一个比较可行的方案，使队员可以依据你

的设计方案书与足够的 protocol 就可以开展合成工作。



请注明各个元件、载体的如何获得，进行实验时引物上的酶切位点如何设计（or 你用其他连接方法也是可以的），等必要的设计内容。

3. 已知一组含 riboswitches 的简单调控系统在实验中表现低于预期的动态范围（Dynamic Range）和正交性，你认为可能原因是什么？如何解决？并在你的解决方案的基础之上设计一个三输入的 AND 门。

B. 建模

1. 文献检索与快速阅读分析：评价一篇你认为与合成、系统以及定量生物学方面相关 or 有借鉴意义的建模的文献。（新酶设计、docking、网络回路的 ODE 模型、粗粒化模型、tit for tat 或其他任意形式的数学建模）

2. 网络回路模型构建：

(1) 如果你做了 A1 题，那么请对该题中所找到的网络回路，建立一个简单的数学模型。

(2) 设计一个具有周期性振荡特点的网络回路，尽可能提高鲁棒性、降低复杂度，并对其进行建模。

3. 蛋白建模：如何设计一段 linker 连接 TALE 与 KRAB repression

domain, 简明的介绍你比较熟悉的方法, 其原理以及注意事项, 并对评价这种方法的优缺点。

C. 管理工作

1. 考虑到干实验的工作地点较为灵活, 不像湿实验都集中在一起便于平时的交流讨论, 你认为如何可行地加强湿实验组和干实验组同学之间的相互交流提高团队协作效率?

2. 假设今年在 7 月中旬发布通知我们将于 10 月 4 日赴香港科技大学参加亚洲区预选赛, 请列一个简明的工作日程表, 尽可能周全, 并注明注意事项。

D. 美工设计

1. 评价 LMU-Munich2012 Slovenia2012 的 wiki。
2. 评价 Groningen 的 poster。

五、 鸣谢



金斯瑞生物科技

Make Research Easy

金斯瑞生物科技有限公司



Synbio Tech

Genes for Life

苏州泓迅生物科技有限公司



奥泰医疗系统有限责任公司



北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司