

2017國立清華大學參與國際基因工程競賽

(International Genetically Engineered Machine competition, iGEM競賽)

成果報告

通訊作者：團隊隊長詹崴仁 (weiren1005@gmail.com)

I. 計畫內容概述

企劃簡介

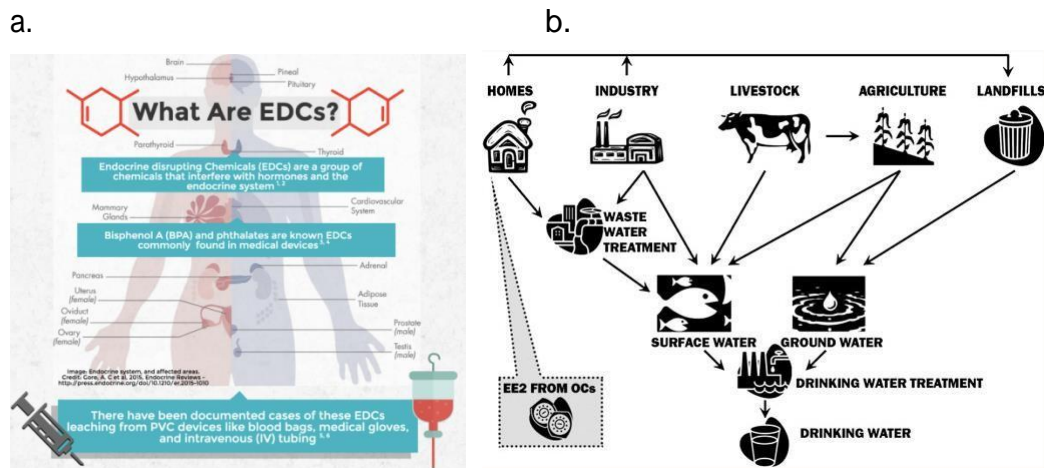
環境荷爾蒙定義為對人類及其子代的內分泌功能可能造成干擾的物質，又稱為內分泌干擾素。在化學工業長期發展下，人類在製造產品的過程中，連帶產生了各種新興環境荷爾蒙，隨著廢棄物或工業汗水被排放到環境中。尤其是在塑膠產業以及紡織業最為嚴重。近來因致病機理逐漸明朗而廣為人知的環境荷爾蒙，如戴奧辛、雙酚 A、壬基苯酚，其嚴重的危害逐漸為人所知。

在正常情況下，人類產生的激素會和相對的受體結合，進而調整、控制各種生理機能。然而，在環境荷爾蒙進入人體後，會因為其化學性質與激素分子的相近，影響某些激素系統的控制和平衡，進而對生理活動造成影響，特別是孩童，青少年和孕婦，其體內的生長發育機制複雜，如果用以控制的激素系統受到擾亂，後果嚴重。

依種類不同，某些環境荷爾蒙可與人體激素的受體結合，造成促進或抑制生理反應的效果。環境荷爾蒙也可能影響細胞內訊息傳遞的路徑，藉此產生特定的蛋白質，影響生理表現。最為常見的是，環境荷爾蒙和人類的雌激素受體(ER)結合，促進動情素產生，在生殖功能方面，最嚴重可能到達不孕的症狀。另外，EDCs 還可能對免疫功能造成干擾，甚至誘發癌症。

環境荷爾蒙另一個可怕之處在於其能夠長久存在於環境中。當初越戰時使用的橙劑，有很大部分的成分是戴奧辛，其噴灑後長期造成附近民眾生殖方面的傷害，畸形兒出生的頻率也激升。直到現在，有人推論橙劑仍危害著當地民眾。人類透過食物鏈攝取到環境中的脂溶性環境荷爾蒙後，這些物質可經由生物累積作用，對人類造成更大的傷害。

在近十年來，世界各國已經開始重視環境荷爾蒙的議題，不僅世紀之毒-戴奧辛曾被多次提出來討論，像是壬基苯酚這種化學物質也已被歐美許多國家禁用，減少對人類造成影響。但是 EDCs 種類繁多，有許多 EDCs 說不定還未被人類發現，再者環境中也長久累積許多 EDCs。所以汗水中環境荷爾蒙的分解，和檢測都是急需解決的問題，故我們想以環境荷爾蒙的檢測與處理作為我們的競賽題目。



圖(一) a. 環境賀爾蒙的簡介 b. 環境賀爾蒙的來源

iGEM 競賽介紹

iGEM (International Genetically Engineered Machine Competition) 國際遺傳工程機器設計競賽，從2004 年開始由麻省理工大學主辦的國際性大學競賽，至2016 年， 單屆競賽已吸引了39 個國家，超過300 個團隊、5000 名大學生參賽，規模逐年增加，競賽分為高中生、大學生、研究生組。競賽的宗旨是利用合成生物學來解決與生活習習相關的問題，由學生主導，發想題目、設計生物組件，且實驗驗證其功能性。每組隊伍會拿到一套大會提供的基礎生物零件，也有歷年隊伍的常用基因組。每組隊伍利用基礎的生物元件和自己設計的元件，發想出一套具創意且能解決我們生活問題的提案，範圍可包含生物偵測、能源、環境、食物營養、醫療衛生等。除了傳統的生物應用之外，近幾屆有出現：生物藝術的應用、創造一套自動化的生物技術硬體設備，或是撰寫出生物資訊的軟體平台..... 等，皆是新興的題目設計。

參加此競賽不僅需要合成生物學的相關知識技能，更需要整合多方面的能力，如數據模擬、網頁設計、人群參與等，團隊的組建也需要各方面的人才，可說是一個跨領域的全方位競賽。競賽過程不僅是對學生的磨練，更是為未來投入產業界打下良好的基礎。過往也有許多團隊將參與 iGEM 競賽的題目改良後投入創業，競賽期間亦有許多生技、創投公司尋覓人才以及創新發想的點子。

團隊介紹

清華 iGEM 團隊創立於 2014 年 12 月，由生科系 16 級何達文與幾位 18 級同學共同創立，經過一系列的籌備，原希望能在 2015 年參賽，但由於經費以及各項困境，2015 年僅止於亞洲交流會議，但團員們並未因此氣餒，招募新成員後進行新一輪的競賽籌備，充實理論知識以及精進實驗技巧，提出「分解新興污染物 PFCs」計畫，參與 2016 年亞洲交流會議，並於同年 10 月代表清華大學前往美國波士頓首次參賽，並獲得銅牌。

第一屆團員歸國後隨即召開第二屆的籌備, 招募成員進行理論以及實驗培訓, 本次團隊成員囊括大一到大四各系人才, 從動機、材料、化學、生科、電機到醫科, 以環境賀爾蒙的生物降解器為題目, 希望能在 2017 年奪取金牌, 並將榮耀帶回清華, 繼續傳承清華 iGEM 的傳統給未來的學弟妹們。

隊長 (Team Leader)

詹崑仁 (化學系19級)

團隊成員 (Team members)

實驗組 (Wet Lab)

組長：陳鐸文 (生科系 20 級) 組員：詹崑仁(化學系 19 級) / 舒啟紘 (化學系 19 級) / 楊庭 (化學系19 級) / 郭哲維 (醫環系20 級) / 陳安彤 (醫環系20 級) / 高竟琳 (生科系20 級)

數據模擬組 (Dry Lab)

組長：蕭荏軒 (動機系 17 級) 組員：曾國璋 (材料系 17 級) / 侯權恩 (動機系 17 級) / 廖奕竣 (化工 17 級)

人群參與組 (Human Practice)

組長：卓翰林 (化工系16級) 組員：曾國璋 (材料系17級) / 周俞廷 (醫環17級) / 張芷華 (生科系20級) / 魏芯吟 (醫環系20級)

實驗設計－實驗組 (Wet Lab)

短期目標：

1. 尋找出可降解且穩定性高的分解酵素，並將其酵素的目標序列與基因序列模組(biobrick)連接。

A. 核心基因

- (1)T7 啟動子(BBa_1712074)：

T7 啟動子具有專一性，只能藉由特定的 T7 RNA 聚合酶轉錄。為確保目標基因能被大量表現我們選用帶有可合成 T7 RNA 聚合酶基因序列的大腸桿菌 DH5 α 。

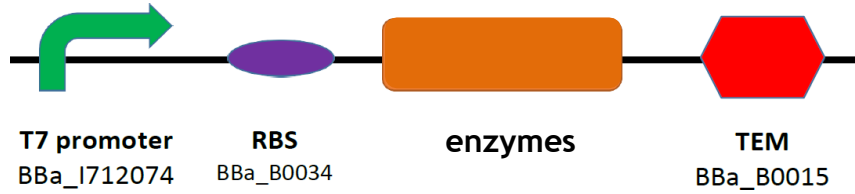
- (2)核糖體結合位(Ribosome Binding Site, RBS, BBa_B0034)
當一 DNA 序列轉錄成 mRNA 時，可提供一結合位供核糖體使用。

- (3)Laccase、manganese peroxidase 以及 horseradish peroxidase 這 3 類酵素都是可針對含有酚類官能基的環境賀爾蒙，並將其降解，以減少生物毒性。我們主要將目標依序來自 *Moniliophthora roreri*、*Trametes versicolor* 和 *Armoracia rusticana* 所產生的過氧化酶。許多實驗報告顯示，此三種

生物能分解 BPA 和 NP，因此我們希望將三組分解酵素基因轉殖至 *E. coli* 中，並純化基因工程處理後的酵素。

(4) 終止基因，TEM (BBa_B0015)

使 RNA 聚合酶停止轉錄。

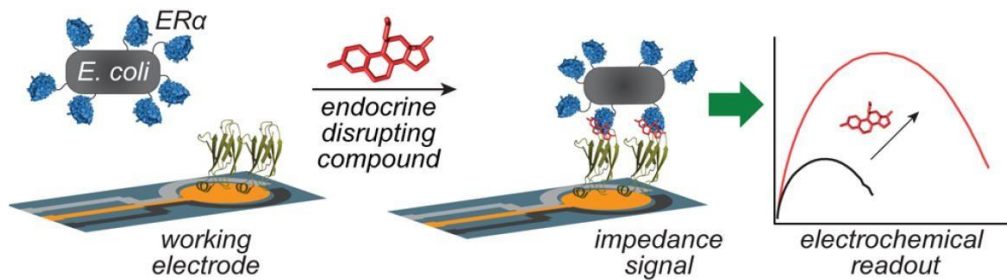


圖(二) 核心 Biobrick 設計

2. 將核心基因後端再接上 *GFP*，轉殖入 *E. coli* DH5 α 品系培養，並設計 Bioreactor 來測量生長曲線、蛋白質表現 (透過 *GFP* 的表現量)

3. 檢測環境荷爾蒙

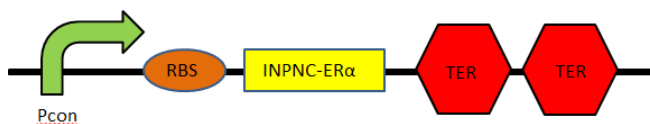
下圖為示意圖



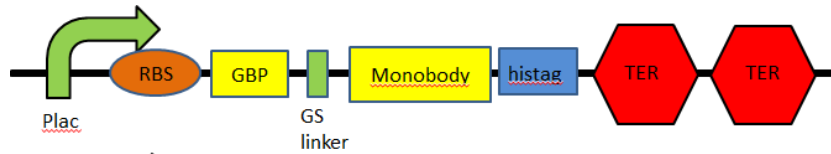
概念說明：

在大腸桿菌的表面表現人類雌激素受體 (Estrogen Receptor α , ER α)，ER α 會與雌激素以及環境荷爾蒙結合，再在金電極上接上特殊的單體 (Monobody) 這種單體會辨識反應中心有受質的 ER α 並與之結合。綜上所述，將冷凍乾燥的大腸桿菌與待測樣本流過電極表面，若樣本中含有環境荷爾蒙，則大腸桿菌會被帶到金電極上，透過檢測金電極與參考電極的阻抗變化，即可推得樣本中的環境荷爾蒙濃度。

基因設計：



以持續性表現的啟動子表現 INPNC-ER α ，INPNC 為細菌膜上的冰晶核蛋



白，可以透過 Fusion Protein 技術，將 INPNC 與目標蛋白融合，可將目標蛋白表現到細胞膜上（朝外）

此為單體製造的基因元件，以 Lac 操縱子調控基因表現。GBP 為 Gold Binding Peptide，可將與之連結的蛋白連接到黃金表面。中間的 GS linker 可連接兩蛋白避免摺疊錯誤。後方的 Histag 為純化蛋白質之用。

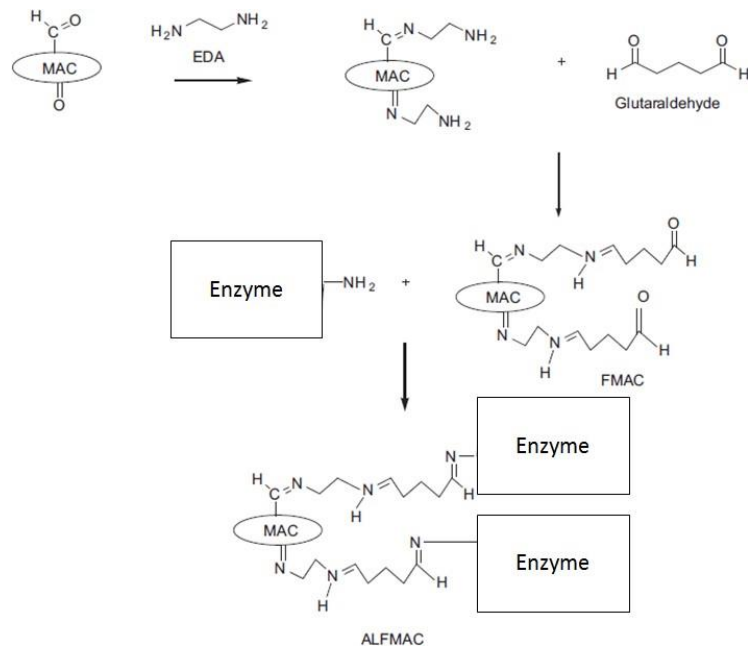
中期目標：

將分解酵素以化學方法以共價鍵的方式固定在活性碳上

1. 測試哪一個來源的基因在降解環境賀爾蒙上有最好的效率。

實驗設計：

將 3 個來源的分解酵素基因分別轉殖入兩組大腸桿菌中，再將分泌的酵素純化出來。將等量的三組酵素分別以化學方法將其固定在活性碳上。實驗過程中將活性碳系統處理濃度為 1 μg/L 的 BPA 和 NP，經過 2 小時的分解處理再以 HPLC 鑑定其分解效率。



圖(三) 化學方法固定酵素在活性碳上(MAC)

2. 測試是否能降解實際含有環境賀爾蒙的汗水。

實驗設計：

我們會將分解活性碳和含有環境賀爾蒙的汗水，同時檢測環境賀爾蒙濃度化。

長期目標：

1. 與生產塑膠相關產品的工業公司合作(生產時的工業廢水含有環境賀爾蒙)。
2. 建立我們設計的裝置去模仿汗水處理廠的處理設備
3. 將我們設計的基因序列送至不同物種，如：酵母菌或是藻類表現。

實驗設計—數據模擬組 (Dry Lab)

數據模擬組分為以下兩部分：

1. 電腦模擬

- ① Docking—由於本次企劃核心概念為使用酵素分解目標物質，而此種酵素是否能與我們目標物質(BPA 和NP)結合是其中關鍵，因此我們透過兩個軟體，Vina 及 Autodock，進行電腦模擬酵素—受質結合狀況。
- ② 分子動力學模擬 (Molecule Dynamic Simulation) —在Docking 結束後，我們需要以分子動力學的角度對酵素與受質進行觀察，了解兩者是否能維持一段時期的穩定結合，且模擬過程中會輸入實驗組所使用的相關參數。
- ③ 酵素動力學模擬—以米氏動力學 (Michaelis-Menten kinetics) 作為理論基礎，輸入酵素相關參數，對分解效率進行模擬。

2. 活性碳分解系統與環境賀爾蒙偵測器的製作

- (1) 活性碳分解系統：本分解系統分為靜態與動態水域之分解
 - a. 動態水域：主要針對塑膠工廠的汗水出口，將活性碳分解系統製作成濾芯的裝置，並輔以環境賀爾蒙偵測系統，以監測何時該替換濾芯。
 - b. 靜態水域：以可透水的半透膜材料包覆住活性碳分解系統，以作成類似茶包的方式投入水中進行分解。
- (2) 環境賀爾蒙偵測器：偵測方面則是將雌激素受體表現在 E. coli 的細胞膜上，並將其冷凍殺死(基於生物安全性)，並在金電極上接上和接有環境賀爾蒙的雌激素受體結合的 monobody。當樣本中含有環境賀爾蒙時雌激素受體可和其結合，接著 monobody 則和接有環境賀爾蒙的雌激素受體結合，而當 monobody 接上細菌後會使電極的電阻提升，藉此偵測樣本中環境賀爾蒙的濃度。

3. iGEM wiki 網站架設

iGEM 官方要求所有參賽隊伍需在其給定之架構下架設 wiki 網頁，將我們的計畫與全世界的其他隊伍分享、交流，進而引發更多新的思考，也可提供後人參考。

4. 人群參與

清華 iGEM 團隊於 2014 年年底成立，這次則由第一屆團隊從波士頓取得銅牌回國後立即展開新血招募，在寒假進行基礎合成生物學實驗訓練，並於 2017 年四月順利成立第二屆團隊。

我們在第一屆團隊的帶領下腦力激盪幾個月後決定了本次的題目：環境賀爾蒙生物降解器與檢測，其中更鎖定了台灣常見塑膠業排放的雙酚 A 與壬基苯酚進行廢水檢測與處理。

清華 iGEM 是全台唯一由學生發起而組成的團隊，在成立過程中面臨資金、實驗設備、技術與經驗的阻礙，在我們努力突破的同時受到了各界的幫助，因此有著不只是幫清華奪下第一面金牌，更要向大家推廣合成生物學、iGEM 競賽的跨領域合作理念以及我們這次關注的環境賀爾蒙議題。今年暑假自 7/30 至 8/4，我們將派出十一位隊員參加由交大主辦的第五屆 Asia-Pacific iGEM Conference。屆時將與亞洲各大學競賽隊伍們交流並進行第一次的簡報。除了與各國優秀大學切磋，更能提升清華的知名度。

參與亞洲交流會之外，我們在今年四月至台中西苑高中進行 iGEM 推廣，未來將於暑假主辦與中正、中興、交大、陽明、長庚大學的交流會；並於九月至竹中、竹女、雄中、雄女、嘉中、新竹實中、康橋中學等高中推廣，更會至各高中生物研習社舉辦小型實驗社課，且發行本次實驗介紹小冊子，讓環境賀爾蒙生物降解器的概念可以被分享出去。

在推廣理念與將清華 iGEM 介紹給世界的同時，我們希望能實際地將實驗產品回饋給台灣這塊土地，因此將在暑假安排參訪自來水廠、污水處理廠與塑膠工廠，除了拿取檢體、深入了解台灣廢水處理現況之外，更能讓接觸到的工廠對我們的計劃有初步認識，未來倘若有幸合作，這將會是很棒的接洽經驗。

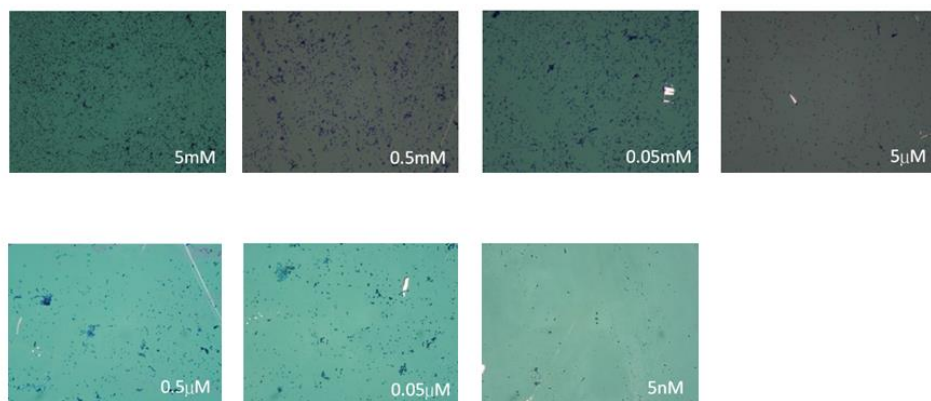
在近十年來，世界各國已經開始重視工業產生的環境荷爾蒙議題，不僅世紀之毒-戴奧辛曾被多次提出來討論，像是壬基苯酚這種化學物質也已被歐美許多國家禁用，減少對人類造成影響。但是 EDCs 種類繁多，有許多 EDCs 說不定還未被人類發現。環境荷爾蒙的危害重大，汗水中環境荷爾蒙的分解和檢測都是急需解決的問題。且世界各國對於各工廠 EDCs 廢水的排放仍未透明化，民眾對其危害也並無著實了解。為了能更好的推廣 EDCs 的知識，我們將自臉書粉專實行一週一知識集的分形式，讓任何有興趣的民眾、學生們可以輕鬆且方便取得這些資訊，在我們將清華 iGEM 邁向世界的同時，使台灣的人們也能提高環境與健康意識，達成回饋給大眾的最終理念。

II. 執行概況

今年清華 iGEM 代表隊成功地於時間內完成競賽研究與其相關要求，並於今年的大會中奪下銀牌。

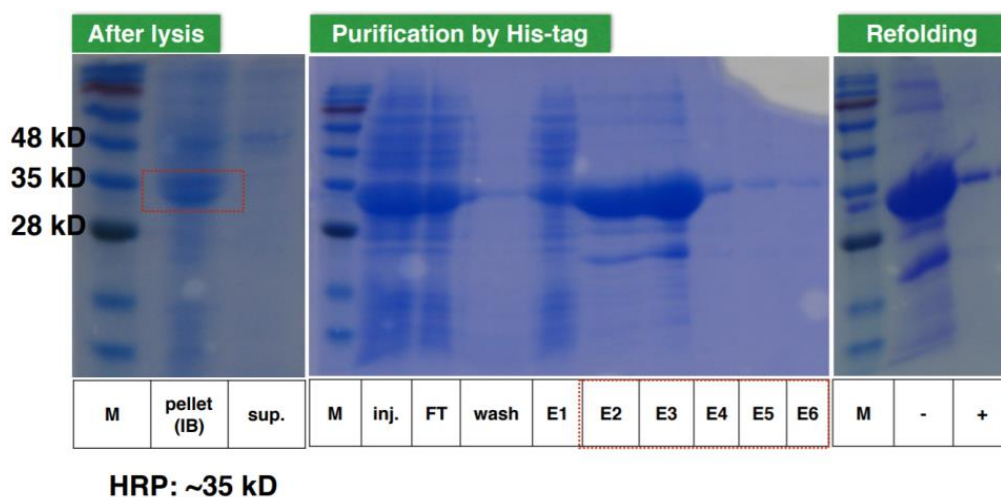
Wet lab 實驗部分：

(1) 於測試環境賀爾蒙的實驗遇到瓶頸，但有想到其他檢驗該實驗效果之分析方法，故以替代方法克服其問題，並驗證了我們的環境賀爾蒙偵測系統是有效於數分鐘內立即偵測濃度約為 1ppm 的污染水體。



圖(四) 替代檢測法是意圖

(2) 於分解環境賀爾蒙的實驗中，成功的生產並純化出大量可降解環境賀爾蒙的酵素。



圖(五) 蛋白質純化示意圖

Dry lab 部分

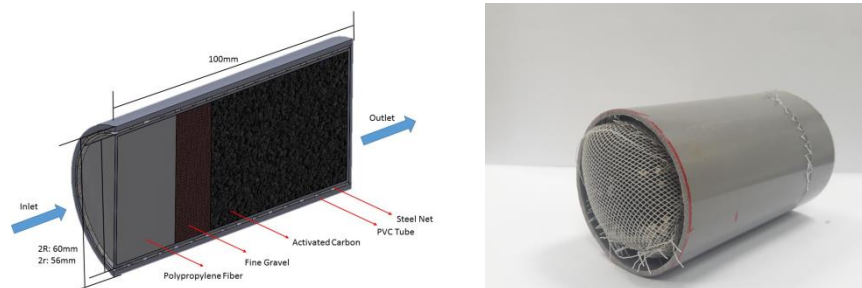
本團隊成功設計出一套可以同時分解與即時偵測環境賀爾蒙的硬軟體設備，並實際測試其效果。



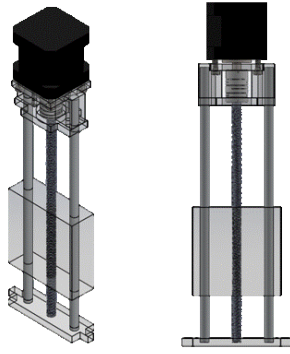
圖(六) 整體裝置

(2)硬體部分

本團隊研發一種適合用於農田的活性炭濾心，以減少懸浮微粒的堆積。本團隊將其和整個系統結合並測試其吸附效果，發現有優異的吸附能力。除此之外，本團隊亦研發機械閘門並結合負回饋系統，若有偵測到汙染，即可立即關閉該閘門，減少汙染程度。



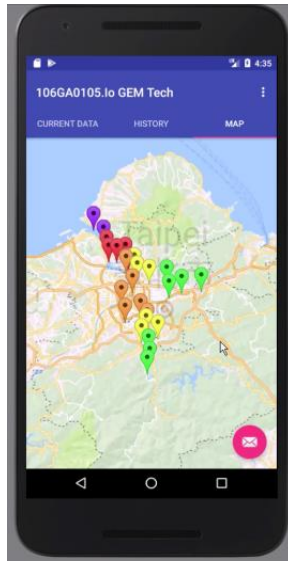
圖(七) 濾心示意圖



圖(八) 機械開門示意圖

(3) 軟體部分

本團隊成功研發出一種可即時監控水質並警告使用者的應用軟體，幫助使用者即時監控水質，並可找到污染源，給於即時的控管。



圖(九) 監控軟體示意圖

III. 經費運用

日期	項目名稱	支出	築夢獎金結餘
106.06.28	築夢獎學金	-	NT\$80,000
106.09.07	模型光固化加工費用	NT\$2,200	NT\$77,800
106.09.14	模型設計費用	NT\$15,000	NT\$62,800
106.09.14	primer	NT\$0	NT\$62,800
106.09.14	玻璃(chip)	NT\$3,750	NT\$59,050
106.09.14	王基苯酚	NT\$5,000	NT\$54,050
106.10.15	壓克力, 保護漆	NT\$900	NT\$53,150
106.10.26	FedEx 運費 (有統編)	NT\$2,784	NT\$50,366
106.10.27	FedEx 基因寄送費用	NT\$3,900	NT\$46,466
106.10.27	HP wiki 翻譯費用	NT\$2,500	NT\$43,966
106.10.31	FedEx 運費 (沒統編)	NT\$1,233	NT\$42,733
106.11.09	影印費用 (Exhibition room)	NT\$381	NT\$42,352
106.11.10	入場報名費(補2人)	NT\$41700	NT\$652
106.11.09	模型Uber運費 (波士頓機場 - 住宿地點)	NT\$611	NT\$41

VI. 具體成效與貢獻

本團隊對於社會之貢獻- 環境領域

1. 我們開發出的環境賀爾蒙偵測系統是可以有效於數分鐘內立即偵測濃度約為 1ppm 的汙染水體(傳統方法需要 1-2 周的時間與成本為我們的數百倍)。
2. 我們成功以基因工程的方式生產並純化出大量可降解環境賀爾蒙的酵素。
3. 設計出一套可以同時分解與即時偵測環境賀爾蒙的硬軟體設備，並實際測試其效果，證實其可行性與商用價值。
4. 本團隊研發一種適合用於農田的活性碳濾心，以減少懸浮微粒的堆積。本團隊將其和整個系統結合並測試其吸附效果，發現有優異的吸附能力。除此之外，本團隊亦研發機械閘門並結合負回饋系統，若有偵測到汙染，即可立即關閉該閘門，減少汙染程度。
5. 本團隊研發出一種可即時監控水質並警告使用者的應用軟體，幫助使用者即時監控水質，並可找到汙染源，給於即時的控管。

V. 結論

本團隊結合生物學、機械工程、資訊工程與化學工程等技術開發出偵測與降解環境賀爾蒙的裝置，其可大大減少該毒素對於農田或魚塭的傷害，並於國際基因工程機械競賽 337 支來自世界各地的隊伍中奪得銀牌的殊榮，對於本國或清華大學在國際上的聲望有所提升外，也加強了清華內各科系掛領域合作的風氣。