**Basic part**

**Her2-affibody(ZHer2:342**)

序列：gtggataacaaatttaacaaagaaatgcgcaacgcgtattgggaaattgcgctgctgccg  
aacctgaacaaccagcagaaacgcgcgtttattcgcagcctgtatgatgatccgagccag  
agcgcgaacctgctggcggaagcgaaaaaactgaacgatgcgcaggcgccgaaa

此部件来源：查找文献，之后在NCBI网站获得，之后进行了密码子优化

简要说明；Her2是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体，在细胞生长调节、存活和分化中具有重要作用,同时Her2在乳腺癌、卵巢癌、胃癌和涎腺肿瘤中都有过度表达，是癌症诊断和治疗的一个有吸引力的靶点。因此选择HER2作为靶点，使用抗HER2抗体进行肿瘤特异性靶向【因为它对HER2有很高的亲和力（KD=22 pmol/L），并且体积小（58个氨基酸）】。

我们将抗HER2抗体基因导入E.coli Nissle 1917 (EcN）中，成功表达后就具有双靶向的作用，提高了治疗的准确性。

零件类型：

设计注意事项：去除限制位点的突变、密码子优化

**pelB:**

序列：atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggcc

(aa. MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA)

此部件来源：从NCBI网站获得

简要说明：pelb是一种分泌信号肽，被广泛用于将外源蛋白输出到大肠杆菌胞质空间或者直接分泌到胞外培养基中。当连接到一个蛋白质时，将蛋白质导向大肠杆菌的周质膜，在那里序列被pelB肽酶去除。 它被用来将蛋白-抗原融合物直接包裹到细胞表面。

零件类型：

设计注意事项：去除限制位点的突变、密码子优化

**6xHis-tag**

序列： catcaccatcaccatcat

此部件来源：参考文献

简要说明：6xHis-tag是一种重组蛋白融合肽标签，可通过快速、灵敏的均相分析或Western blot中的比色检测进行检测。 蛋白质也可以使用一步亲和分离方法从粗提取物中快速纯化。该部件用于检测构建的融合蛋白是否成功表达。

零件类型：

设计注意事项：密码子优化，便于检测

isoleucine zipper：

将人工三聚体基序掺入 TRAIL 蛋白可增强生物活性。在这里，我们展示了异亮氨酸拉链六聚化基序与 TRAIL 的 N 末端的连接，导致其三聚体形式的多聚化，与其天然状态相比具有更高的细胞毒活性。[1]

TAAACAGATCGAGGACAAAATCGAAGAAATTCTGAGCAAAATCTACCACATCGAGAACGAGATCGCGCGCATCAAAAAACTGATCGGCGAACGCGA

[1] Han J H, Moon A R, Chang J H, et al. Potentiation of TRAIL killing activity by multimerization through isoleucine zipper hexamerization motif[J]. BMB reports, 2016, 49(5): 282.

sTRAIL:

肿瘤坏死因子 (TNF) 相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 最初被鉴定为 TNF 家族的成员，可以在各种癌细胞中诱导凋亡。大多数转化肿瘤细胞中 TRAIL 介导的凋亡诱导是通过刺激其同源受体 DR4（或 TRAILR1）和 DR5（或 TRAILR2）而发生的。TRAIL是型跨膜蛋白，其可以在通过其胞外区的蛋白酶介导的切割的可溶形式或通过该包含其胞外区重组形式的细菌表达而产生。TRAIL的结构研究揭示，它形成三聚体，其进一步结合到三聚体蛋白DR5 。TRAIL 可以以其天然可溶性形式形成诱导细胞凋亡的三聚体。[1]

作为一种II型跨膜蛋白，痕迹可以被特定的蛋白酶裂解，细胞外区域形成一个可溶性分子。蛋白质晶体结构的研究表明，可溶性TRAIL(sTRAIL)形成一个同型三聚体，这是受体识别和凋亡功能的关键结构。[2]我们对sTRAIL序列进行改进，删除了几个氨基酸，并进行密码子优化，使其更容易在我们所使用的E. coli Nissle 1917（ECN）中表达。通过在sTRAIL的N端连接一个isoleucine zipper，导致其三聚化，与其天然状态相比具有更高的细胞毒活性。

[1] Han J H, Moon A R, Chang J H, et al. Potentiation of TRAIL killing activity by multimerization through isoleucine zipper hexamerization motif[J]. BMB reports, 2016, 49(5): 282.

[2] Yan C, Li S, Li Z, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells as vehicles of CD20-specific TRAIL fusion protein delivery: a double-target therapy against non-Hodgkin’s lymphoma[J]. Molecular pharmaceutics, 2013, 10(1): 142-151.

AGTTCGCGAACGCGGTCCGCAACGTGTTGCAGCACATATTACCGGTACCCGTGGTCGTAGTAATACCCTGAGTAGTCCGAACAGCAAAAACGAGAAAGCGCTGGGTCGTAAAATCAACAGCTGGGAAAGCAGCCGTAGCGGTCATAGCTTTCTGAGCAACCTGCATCTGCGTAACGGCGAACTGGTTATCCACGAGAAAGGCTTCTACTACATCTACAGCCAGACCTACTTCCGCTTCCAGGAAGAAATTAAAGAGAACACCAAAAACGACAAACAGATGGTCCAGTACATCTACAAATACACCAGCTACCCGGATCCGATTCTGCTGATGAAAAGCGCGCGTAACAGCTGTTGGAGTAAAGACGCGGAATACGGTCTGTACAGCATCTATCAGGGCGGCATTTTCGAGCTGAAAGAGAACGATCGCATCTTCGTCAGCGTTACCAACGAGCATCTGATCGACATGGACCACGAAGCAAGCTTTTTCGGCGCGTTTCTGGTTGGTTAACT

Vgb

革兰氏阴性需氧菌Vitreoscilla的Vitreoscilla血红蛋白 (VHb)是第一个发现的细菌血红蛋白。它的功能是隔离氧气，特别是当它处于低浓度时，并将其输送到末端呼吸氧化酶，从而增强氧化磷酸化。[1]

将Vitreoscilla hemoglobin gene (vgb) 引入大肠杆菌，细胞生长和靶蛋白产量显着增加。vgb启动子在转录水平受氧调节，低通气条件足以诱导 VHb 基因表达。[2]我们利用vgb启动子替换pET-28A(+)的T7启动子，使E. coli Nissle 1917（ECN）能够在低氧条件下进行转录。

[1] Kim Y, Webster D A, Stark B C. Improvement of bioremediation by Pseudomonas and Burkholderia by mutants of the Vitreoscilla hemoglobin gene (vgb) integrated into their chromosomes[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(4): 148-154.

[2] Liu T, Chen J-Y, Zheng Z, et al. Construction of highly efficient E. coli expression systems containing low oxygen induced promoter and partition region[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2005, 68(3): 346-354.

acaggacgctggggttaaaagtatttgagttttgatgtggattaagttttaagaggcaataaagattataataagtgctgctacaccatactgatgtatggcaaaaccataataatgaacttaaggaagaccctc

Q:Enter any design considerations you had to deal with during the detailed design of the sequence.

低氧环境没控制好而无法转录。