**描述（Description）**

**综述（Abstract）：**

**灵感(Inspiration)**:在一次查阅资料的时候，我们发现了在2020年女性乳腺癌已超过肺癌成为最常见的癌症，估计有 230 万新病例（11.7%），其次是肺癌(11.4%)、结直肠癌 (10.0%)、前列腺癌 (7.3%) 和胃癌 (5.6%)。而乳腺癌的在人群中的发病，越来越趋向于青年化，在中国，乳腺癌更容易发生在相对年轻的妇女中。目前所有的传统癌症疗法其毒副作用大，且它会无差别攻击正常细胞。经研究发现一些细菌具有靶向乳腺癌细胞并抑制其生长的功能。因此，我们计划使用工程细菌来治疗乳腺癌。

**设计（design）**：在这种情况下，我们基于使用靶向技术对细菌进行基因工程改造，使其能够特异性识别和杀死乳腺癌细胞。其中Ecoli-Nissle 1917显示出较高的肿瘤靶向能力。此外，Ecoli-Nissle 1917已广泛用于治疗婴幼儿急性腹泻和某些肠道疾病，以及日常保健产品。基于这些优势，我们选择了Ecoli-Nissle 1917作为载体将我们构建的具有相对应基因序列的质粒运送至实体癌。Ecoli Nissle 1917 是一种无毒无害的菌，我们对其进行改造使其能够特异性识别乳腺癌细胞的同时，并且能够释放毒蛋白，与癌细胞受体结合使其凋亡。

人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2,HER2）是乳腺癌原癌基因，是最具有代表性的乳腺癌标志物。HER2与乳腺癌的发展、恶性转化和不良预后密切相关，高表达的HER2是乳腺癌靶向治疗效果和术后疗效的重要预测标志物。我们选择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，并且体积小（58个氨基酸）。28 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,它是癌症诊断和治疗的一个有吸引力的靶点。而且我们设计的Her 2具有新的序列，以此来满足igem的part部分的要求。

我们构建两个质粒，第一个是验证具有三聚化结构域的sTRAIL融合蛋白可以使乳腺癌细胞凋亡。该质粒（使用T7 promoter,后面连接操纵子lacI序列）构建完成后将导入大肠杆菌BL21（DE3）中（噬菌体乳糖操纵子模型），后使用IPTG诱导获得诱导表达，可表达纯化出含有His标签的Her2人工抗体和ISZ-sTRAIL的融合蛋白，获得的融合蛋白再与乳腺癌细胞共同培养用于证明融合蛋白具有使乳腺癌细胞凋亡的功能。在这过程中也要同时构建不同的质粒表达体系，如将sTRAIL蛋白质、sTRAIL-人工抗体融合蛋白分别转化到大肠杆菌BL21（DE3）中使用IPTG诱导获得诱导表达菌株，以验证我们方案的正确性。这样我们才能继续做后续实验以证明，我们构建的工程菌在癌细胞聚集的群体中，在低氧环境的条件下能够靶向识别癌细胞并且能够使癌细胞凋亡。第二个质粒则是在第一个质粒的基础上添加低氧启动子来直接验证经过改造后的菌种能否作用于乳腺癌细胞的功能。

展望（prospect）：我们寄希望于这个工程菌能够给现阶段的癌症治疗带来一个更加有效的、少毒副作用的治疗方式，为其他疾病的治疗提供一种新的思路和方向。因为目前的癌症治疗还是以化疗和放射性治疗为主，虽然治疗效果显著，但是也同时具有很强的副作用，对于身体有着不可恢复的伤害。我们利用工程菌治疗乳腺癌，不仅能够靶向高效率治疗，同时也可以定点作用于癌细胞，在低氧环境下表达正好可以靶向癌细胞酸性低氧微环境，接触后表达对应基因并释放毒蛋白作用于癌细胞，使其死亡。在将来，生物治疗研发会越来越完善，克服一些问题后，人类以后的癌症治疗将会变的越来越好，前景会变得越来越光明。

Part：

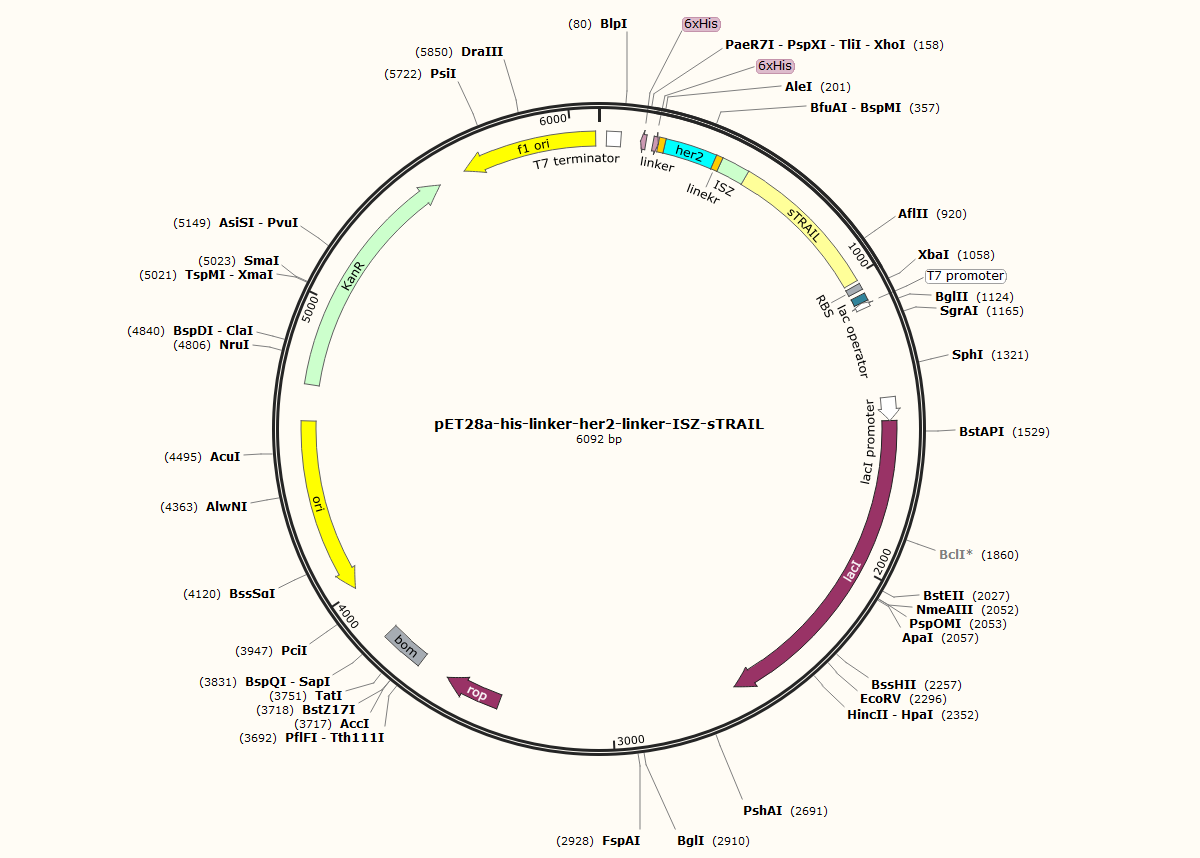
质粒1：

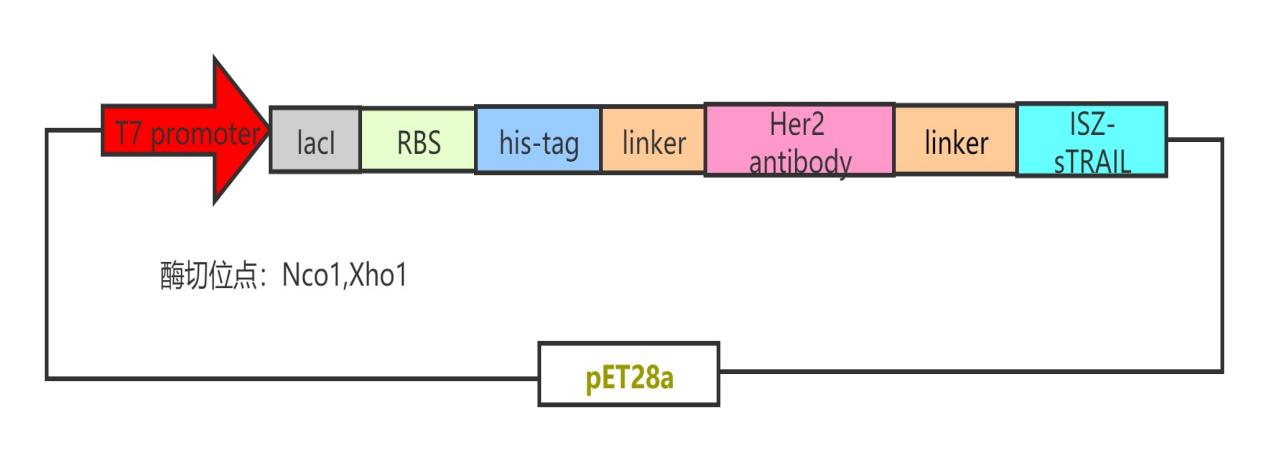
选择改造此质粒的原因是因为我们原本的想法是设计一种新型具有特异性识别癌细胞的双靶向治疗菌。设计之前，我们必须得要先验证融合蛋白是否具有与癌细胞表面死亡受体结合并启动细胞凋亡的功能。将该质粒（使用T7 promoter,后面连接操纵子lacI序列）导入大肠杆菌BL21（DE3）中（噬菌体乳糖操纵子模型），后使用IPTG诱导获得诱导表达，可表达出含有His标签的Her2人工抗体和ISZ-sTRAIL的融合蛋白。

其中我们引入了新的部件，三聚化结构域（ISZ），分泌肽（pelB），而且选用的Her2人工抗体具有新的序列，我们还改造了其他的part以来满足igem的要求。

在该载体的基础上，使用搭桥PCR技术将部分基因序列复制构建到质粒2中。（回收获得质粒1中删除启动子部分的插入序列，在序列的底部设计引物同时在质粒2中设计反向引物之后搭桥将这两段序列拼接起来）。我们还更新了质粒，利用密码子的简并性使其能够在工程菌中表达。

CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACGGTGGTGGCGGTTCTGGCGGCGTTGATAATAAATTCAACAAAGAGATGCGCAACGCGTACTGGGAAATTGCACTGCTGCCGAATCTGAACAACCAGCAGAAACGCGCGTTTATTCGCTCTCTGTATGACGATCCGAGCCAATCTGCGAATCTGCTGGCAGAAGCGAAAAAACTGAACGACGCACAAGCACCGAAAGGCGGCGGCGGTTCTGGCGGTAAACAGATCGAGGACAAAATCGAAGAAATTCTGAGCAAAATCTACCACATCGAGAACGAGATCGCGCGCATCAAAAAACTGATCGGCGAACGCGAAGTTCGCGAACGCGGTCCGCAACGTGTTGCAGCACATATTACCGGTACCCGTGGTCGTAGTAATACCCTGAGTAGTCCGAACAGCAAAAACGAGAAAGCGCTGGGTCGTAAAATCAACAGCTGGGAAAGCAGCCGTAGCGGTCATAGCTTTCTGAGCAACCTGCATCTGCGTAACGGCGAACTGGTTATCCACGAGAAAGGCTTCTACTACATCTACAGCCAGACCTACTTCCGCTTCCAGGAAGAAATTAAAGAGAACACCAAAAACGACAAACAGATGGTCCAGTACATCTACAAATACACCAGCTACCCGGATCCGATTCTGCTGATGAAAAGCGCGCGTAACAGCTGTTGGAGTAAAGACGCGGAATACGGTCTGTACAGCATCTATCAGGGCGGCATTTTCGAGCTGAAAGAGAACGATCGCATCTTCGTCAGCGTTACCAACGAGCATCTGATCGACATGGACCACGAAGCAAGCTTTTTCGGCGCGTTTCTGGTTGGTTAACTCGAG

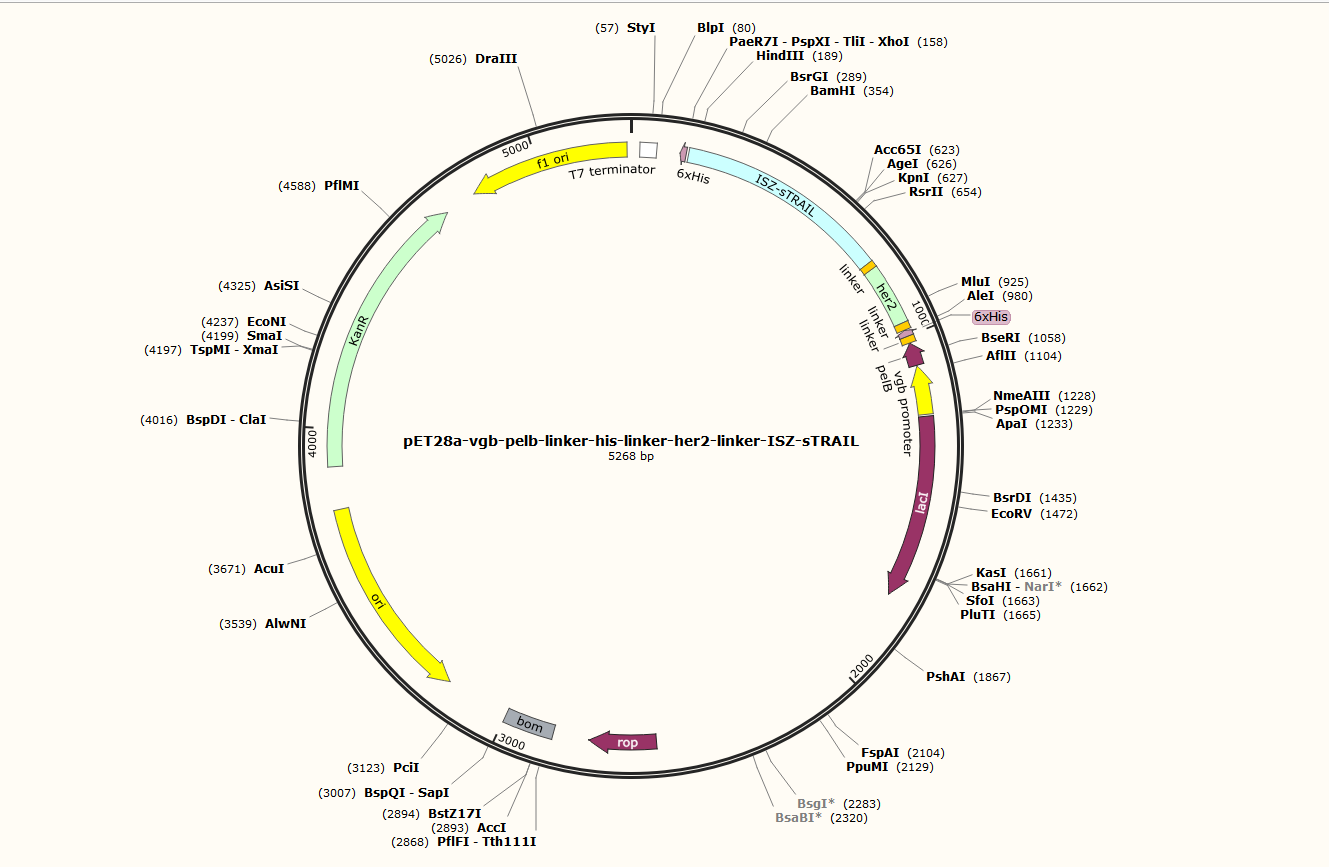


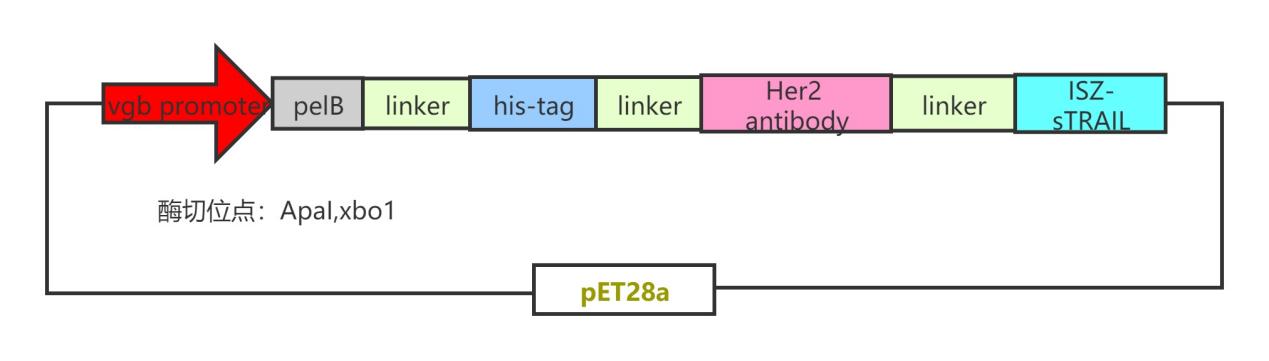
******

质粒2：

我们构建质粒2，验证设计的工程菌可以作用于乳腺癌细胞。首先将原本的T7 promoter删除，人工插入自己构建的低氧诱导序列后面直接连上其他的基因序列。加上低氧诱导启动子，是为了让工程菌能更好的识别癌细胞群体的低氧环境，然后构建的Her 2抗体可以特异性识别癌细胞，从而加大了工程菌的筛选识别癌细胞的作用。同时将sTRAIL蛋白质、sTRAIL-人工抗体融合蛋白也转化到ECN 1917的质粒中，与上述的所有基因一同表达。在实际应用中，工程菌特异性识别癌细胞后，释放融合蛋白与癌细胞死亡受体结合，使癌细胞凋亡以达到杀死癌细胞的目的。

GGGCCCACAGGACGCTGGGGTTAAAAGTATTTGAGTTTTGATGTGGATTAAGTTTTAAGAGGCAATAAAGATTATAATAAGTGCTGCTACACCATACTGATGTATGGCAAAACCATAATAATGAACTTAAGGAAGACCCTCTACTAGATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCGGCGGTGGCGGTAGCGGCGGTCATCATCATCATCATCACGGTGGTGGCGGTTCTGGCGGCGTTGATAATAAATTCAACAAAGAGATGCGCAACGCGTACTGGGAAATTGCACTGCTGCCGAATCTGAACAACCAGCAGAAACGCGCGTTTATTCGCTCTCTGTATGACGATCCGAGCCAATCTGCGAATCTGCTGGCAGAAGCGAAAAAACTGAACGACGCACAAGCACCGAAAGGCGGCGGCGGTTCTGGCGGTAAACAGATCGAGGACAAAATCGAAGAAATTCTGAGCAAAATCTACCACATCGAGAACGAGATCGCGCGCATCAAAAAACTGATCGGCGAACGCGAAGTTCGCGAACGCGGTCCGCAACGTGTTGCAGCACATATTACCGGTACCCGTGGTCGTAGTAATACCCTGAGTAGTCCGAACAGCAAAAACGAGAAAGCGCTGGGTCGTAAAATCAACAGCTGGGAAAGCAGCCGTAGCGGTCATAGCTTTCTGAGCAACCTGCATCTGCGTAACGGCGAACTGGTTATCCACGAGAAAGGCTTCTACTACATCTACAGCCAGACCTACTTCCGCTTCCAGGAAGAAATTAAAGAGAACACCAAAAACGACAAACAGATGGTCCAGTACATCTACAAATACACCAGCTACCCGGATCCGATTCTGCTGATGAAAAGCGCGCGTAACAGCTGTTGGAGTAAAGACGCGGAATACGGTCTGTACAGCATCTATCAGGGCGGCATTTTCGAGCTGAAAGAGAACGATCGCATCTTCGTCAGCGTTACCAACGAGCATCTGATCGACATGGACCACGAAGCAAGCTTTTTCGGCGCGTTTCTGGTTGGTTAACTCGAG



******

Basic part

1. Enter a short description of the part for display in various tables. For example: 'PoPS->cI (lambda)'. 输入零件的简短说明以在各种表格中显示。 例如：'PoPS->cI (lambda)'。

2.Enter a long description of the part so that users of your part know what it is, what it does, and how to use it in their projects. 输入零件的详细说明，以便零件的用户知道它是什么、它做什么以及如何在他们的项目中使用它。

3.Enter the source of this part. For example, does it come from some genomic sequence? 输入这部分的来源。 例如，它是否来自某个基因组序列？

4.Enter any design considerations you had to deal with during the detailed design of the sequence. 输入您在序列的详细设计过程中必须处理的任何设计注意事项。

Composite Part

1.Enter a short description of the part for display in various tables. For example: 'PoPS->cI (lambda) .输入零件的简短说明以在各种表格中显示。 例如：'PoPS->cI (lambda)

2.Enter a long description of the part so that users of your part know what it is, what it does, and how to use it in their projects. 输入零件的详细说明，以便零件的用户知道它是什么、它做什么以及如何在他们的项目中使用它。

3.Enter the source of this part. For example, does it come from some genomic sequence? 输入这部分的来源。 例如，它是否来自某个基因组序列？

4.Enter any design considerations you had to deal with during the detailed design of the sequence. 输入您在序列的详细设计过程中必须处理的任何设计注意事项。