

参赛队员姓名：郭炜航，李帛轩，周浩宇

中学：北京师范大学第二附属中学

省份：北京市

国家/地区：中国

指导教师姓名：王宣，倪川

论文题目：炎症性肠病生物检测器的构建与调试

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员：郭炜航 李帛轩 周浩宇

指导老师：王宣 倪川

2018年 9月 14日

# 炎症性肠病生物检测器的构建与调试

郭炜航<sup>1</sup>, 李帛轩<sup>1</sup>, 周浩宇<sup>1</sup>, 王宣<sup>2</sup>, 倪川<sup>1</sup>

1 北京师范大学第二附属中学, 北京 100192

2 清华大学 生命科学学院与生命科学联合中心, 北京 100084

郭炜航, 李帛轩, 周浩宇, 等. 炎症性肠病生物检测器的构建与调试. 生物工程学报, 2018, 34(12):

Guo WH, Li BX, Zhou HY, et al. Construction and Characterization of Inflammatory Bowel

Disease Bio-detector. Chin J Biotech, 2018, 34(12):

**摘要:** 利用工程改造过的肠道微生物进行无创、便宜便捷的肠道炎症检测、治疗可有效应用于医药行业。肠道炎症通常伴随着肠道中硫代硫酸盐和连四硫酸盐的增加, 双组分系统 ThsSR 和 TtrSR 是两套分别检测这两种小分子的生物感受器系统。采用荧光蛋白作为指示剂需要复杂的测试仪器, 不适用于家用检测环境, 而肉眼可见的色素蛋白和有色小分子作为指示剂将可能增大 ThsSR 和 TtrSR 的应用前景。两套系统分别被转入 *Escherichia coli* Top10 和益生菌 *E. coli* Nissle 1917 中, sfGFP 信号表达效果证明了这两套系统可用。考虑实际应用, sfGFP 被一系列色素蛋白和显色小分子替换, 在 *E. coli* Top10 中, 一系列色素蛋白和紫色杆菌素前体 protoviolaceinic acid 的显色效果, 表明了该系统具有用于实际肠道炎症检测的可行性。结果表明, 改进后的 ThsSR 和 TtrSR 系统能够针对不同浓度的肠道炎症标记物做出相应程度的反应, 具备用于家庭环境人体肠道炎症检测的潜力。

**关键词:** 炎症性肠病, 硫代硫酸盐, 连四硫酸盐, 生物检测器, 色素蛋白, 紫色杆菌素前体

## 目录

|   |    |
|---|----|
| 材料与amp;方法.....                            | 5  |
| 材料.....                                   | 5  |
| 菌株和质粒.....                                | 5  |
| 方法.....                                   | 5  |
| ThsSR 和 TtrSR 目的基因的获得.....                | 5  |
| ThsS/TtrS、ThsR-sfgfp/TtrR-sfgfp 质粒构建..... | 6  |
| ThsR/TtrR-色素蛋白目的基因质粒构建.....               | 6  |
| 流式细胞仪表征.....                              | 6  |
| 模拟粪便颜色观察.....                             | 7  |
| 检测器的构建.....                               | 7  |
| 报告基因的改进.....                              | 7  |
| 新系统的构建.....                               | 9  |
| 讨论.....                                   | 10 |
| REFERENCES.....                           | 11 |

炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease) 包括克罗恩氏症 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC), 是一种慢性特发性肠道疾病。随着炎症性肠病的发病率日益增长, 我国对肠道炎症的检测效果仍面临挑战<sup>[1]</sup>。

在肠道炎症中, 存在于结肠中的硫酸盐还原细菌将饮食和宿主的氧化硫物质转化为 H<sub>2</sub>S 分子。然而, 由于生物体内的 H<sub>2</sub>S 分子难以测量, 试图将 H<sub>2</sub>S 和炎症的产生直接联系起来几乎不可行<sup>[2]</sup>。而人的肠道黏膜会将过多的 H<sub>2</sub>S 转化为硫代硫酸盐<sup>[3]</sup>而去除毒性, 从而使得硫代硫酸盐成为肠道炎症的一种潜在标记物。而 Winter 等<sup>[4]</sup>发现, 宿主体内特定的生物过程还会产生氮氧自由基, 将硫代硫酸盐转化为连四硫酸盐, 从而促进某些肠道炎症细菌如 *Salmonella typhimurium* 的生长。因此硫代硫酸盐和连四硫酸盐的水平可能均与肠道炎症程度相关。

近来, Daeffler 和 Galley 等<sup>[5]</sup>在海洋中的 *Schwanella* 菌属内发现了 ThsSR 和 TtrSR 两套双组分检测系统, 该系统能感应硫代硫酸盐和连四硫酸盐这两种分子, 并激活后续基因的表达。作者将这两套双组分系统连接上报告基因绿色荧光蛋白, 转入 *E. coli* Nissele 1917 中, 灌喂肠道炎症小鼠模型<sup>[6]</sup>, 之后将收集到的小鼠粪便分离出细菌, 利用流式细胞仪来检测细菌的荧光强度, 从而判断小鼠的炎症发生。由于绿色荧光蛋白需要氧气成熟才能发出荧光, 并且需要大型仪器, 应用于实际生活中会有所不便, 因此我们选用色素蛋白或者其他有颜色的分子作为指示剂, 便于使用者在家庭环境下就能够通过观察粪便颜色来判断自身肠道炎症状况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 2.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* Top10 购自北京全式金生物技术有限公司, 大肠杆菌 *E. coli* Nissele 1917 由 Mr. Kai Sheng Hee, NUS Synthetic Biology for Clinical and Technological Innovation (SynCTI) 实验室惠

赠。表达质粒 pSB4K5、pSB1C3 从 iGEM Foundation 获得。表达质粒 pSEVA321 由 Victor DeLorenzo 实验室惠赠, 含色素蛋白基因、紫色杆菌素前体基因质粒从 iGEM Foundation 获得。使用了如下基因:

1. BBa\_K1033910 "fwYellow yellow chromoprotein"
2. BBa\_K1033916 "amajLime yellow-green chromoprotein"
3. BBa\_K592010 "amilGFP yellow chromoprotein"
4. BBa\_K1033919 "gfasPurple purple chromoprotein"
5. BBa\_K1033932 "spisPink pink chromoprotein"
6. BBa\_K592009 "amilCP blue chromoprotein"
7. BBa\_K274003 "Vio operon ABDE".

*sfgfp* 基因序列由清华大学陈国强实验室保存。

涉及到的基因序列见附件一。

### 2.1.2

## 2.2 方法

### 2.2.1 ThsSR 和 TtrSR 目的基因的获得

ThsS、ThsR、TtrS、TtrR 序列见附件一。通过苏州泓迅生物科技股份有限公司合成, 合成序列为常表达启动子-核糖体结合位点-ThsS/TtrS-终止子 (下称 ThsS/TtrS), 常表达启动子-核糖体结合位点-ThsR/TtrR-终止子-ThsR/TtrR 调节启动子-核糖体结合位点 (下称 ThsR/TtrR)。根据 iGEM 要求竞赛和后续 Golden Gate 拼装, 优化 DNA 序列, 删除序列内部 *EcoR* I、*Xba* I、*Spe* I、*Pst* I 和 *Bsa* I 限制性内切酶酶切位点; 为了后续质粒构建, 在两端分别加上 *Bsa* I 酶切位点, 对应的黏性末端分别是: ThsS、TtrS 上下游(5'-3')ggag, agcg; ThsR、TtrR 上下游(5'-3')ggag, cttag。

### 2.2.2 ThsS/TtrS、ThsR-sfgfp/TtrR-sfgfp 质粒构建

利用 Golden Gate 基因拼接方式, 构建质粒。首先通过 PCR 给每个片段加上 *Bsa* I 酶切位点, 方框中表示 *Bsa* I 酶切位点, 下划线表示粘性末端。利用引物 P1 和 P2 扩增 pSB4K5, 引物 P3 和 P4 扩增 pSB1C3, 引物 P5 和 P6 扩增 *sfgfp*。反应条件如下: 98 °C 变性 5 min; 98 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 延伸 1 min 15 s (pSB4K5, pSB1C3), 30 s (*sfgfp*), 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将含有 *Bsa* I 酶切位点的扩增片段 pSB4K5 和 ThsS/TtrS 质粒 (1:1 摩尔体积, 总量不超过 100 ng) 放入 Golden Gate 反应体系中: 1 μL T4 ligase, 1 μL *Bsa* I, 2 μL 10× T4 ligase buffer, 质粒骨架和片段, 补齐 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应条件如下: 37 °C 5 min, 16 °C 10 min, 进行 10 个循环; 然后 37 °C 15 min, 50 °C 5 min, 80 °C 5 min。用同样的方法, 将含有 *Bsa* I 酶切位点的扩增片段 pSB1C3、*sfgfp* 和 ThsR/TtrR 质粒 (1:1:1 摩尔体积, 总量不超过 100 ng) 放入 Golden Gate 反应体系中进行反应。转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 涂布卡那霉素

(pSB4K5)/氯霉素 (pSB1C3) 抗性 LB 固体平板, 挑取 3 个单克隆, 用小量质粒提取试剂盒抽提质粒, 送往苏州泓迅生物科技股份有限公司测序。

利用同样的方法, 我们将 *sfgfp* 替换为粉色 (*spispink*, Part:BBa\_K1033932), 蓝色 (*amilblue*, Part:BBa\_K592009) 和紫色 (*gfaspurple*, Part:BBa\_K1033919) 色素蛋白编码基因。

表 1 引物序列

Table 1 Primer used in this study

| Primer name | Primer sequence (5'-3')                     | Size (bp) |
|-------------|---|-----------|
| P1          | aatt <u>ggctc</u> acgcttactagtagcgccgctgcag | 36        |
| P2          | atat <u>ggctc</u> actccctctagaagcgccgcaat   | 35        |
| P3          | atat <u>ggctc</u> actccctctagaagcgccgcaat   | 35        |

|    |   |    |
|----|---|----|
| P4 | aatt <u>ggctc</u> acgcttactagtagcgccgctgcag             | 36 |
| P5 | gaga <u>ggctc</u> actagatgcgtaaaggcgaagagct             | 35 |
| P6 | cacg <u>ggctc</u> aagcgttattgtacagttcatccatac<br>catgcg | 44 |

*Bsa* I restriction site in frame.

### 2.2.3 ThsR/TtrR-色素蛋白目的基因质粒构建

利用 Gibson Assembly 基因拼接方式构建质粒。选用带有常表达启动子和强 RBS 的 pSEVA321 质粒骨架, 将质粒骨架与 *sfgfp* 和编码色素蛋白基因:

1. BBa\_K1033910 "fwYellow yellow chromoprotein"
2. BBa\_K1033916 "amajLime yellow-green chromoprotein"
3. BBa\_K592010 "amilGFP yellow chromoprotein"
4. BBa\_K1033919 "gfaspurple purple chromoprotein"
5. BBa\_K1033932 "spispink pink chromoprotein"
6. BBa\_K592009 "amilCP blue chromoprotein"
7. BBa\_K274003 "Vio operon ABDE"。

分别 PCR 带上 20 bp 同源臂, 将扩增片段按照 1:1 摩尔比, 总量小于 100 ng 转入 Gibson Assembly 体系中: Gibson Assembly 2× Mix 5 μL, 骨架和 *sfgfp*/色素蛋白编码基因片段, 补齐至 10 μL。反应条件如下: 50 °C 60 min, 80 °C 5 min。转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 涂布氯霉素抗性 LB 固体平板, 挑取 3 个单克隆, 用小量质粒提取试剂盒抽提质粒, 送往苏州泓迅生物科技股份有限公司测序。

### 2.2.4 流式细胞仪表征

将构建成功的质粒按照 ThsS+ThsR, TtrS+TtrR 的组合分别转入 *E. coli* Top10 和 *E. coli* Nissle 1917 感受态中, 平板培养 24 h。分别挑取三个单克隆加入含有 25 μg/mL 氯霉素、50 μg/mL 卡

那霉素的 LB 培养液中 37 °C, 200 r/min 培养过夜, 然后稀释过夜的菌液 200 倍, 使用 200 μL 96 孔板盖上呼吸膜在微孔振荡器中, 含有抗生素的 M9 培养基 37 °C 1 000 r/min 生长 3 h, 然后再将该菌液稀释 700 倍, 使用 200 μL 96 孔板盖上呼吸膜在微孔振荡器中, 含有抗生素, 以及不同浓度连四硫酸钠 (0, 0.01 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.7 mmol/L; 针对含 TtrS+TtrR 的菌), 硫代硫酸钠 (0, 0.01 mmol/L, 0.1 mmol/L, 1 mmol/L; 针对含 ThsS+ThsR 的菌) 的 M9 培养基 37 °C 1 000 r/min 生长 6 h。从中取 15 μL 菌液至 185 μL 1×PBS 溶液 (含 2 mg/mL 卡那霉素) 中, 做流式细胞仪测试)。本实验使用不含 *sfgfp* 质粒的 *E. coli* 作为阴性对照。流式细胞仪使用清华大学生物医学测试中心 BD LSRFortessa FITC 通道观测 sfGFP 荧光强度。

### 2.2.5 模拟粪便颜色观察

将构建成功的 pSEVA321-*sfgfp*/色素蛋白编码基因质粒转入 *E. coli* Top10 中, 平板培养 24 h。分别挑取 1 个单克隆加入含有 25 μg/mL 氯霉素的 20 mL LB 培养液中 37 °C, 200 r/min 培养过夜, 在 50 mL 离心管中离心后加入 1 g“模拟粪便”咖喱和 500 μL 水混匀, 观察混合颜色。

## 2 结果与分析

### 3.1 检测器的构建

我们首先按照如下基因线路图搭建了检测器。

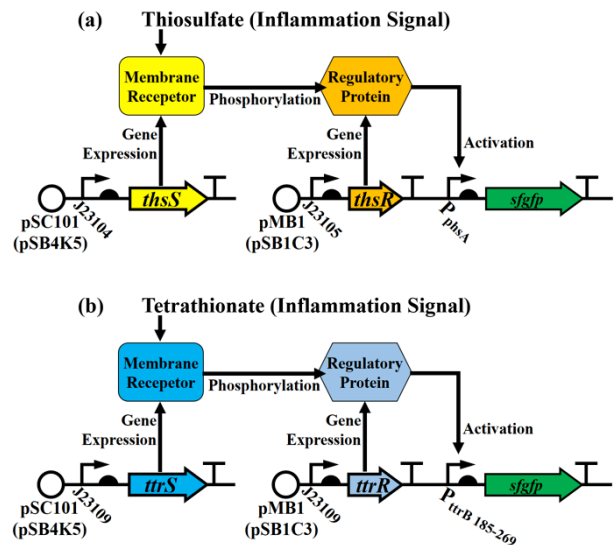


图 1: 生物传感器(a)ThsSR 和(b)TtrSR 的基因线路图

Fig. 1 Gene circuits of ThsSR (A) and TtrSR (B) bio-sensor

(A) ThsS expresses constitutively, and the expressed sensor protein will be incorporated into cell membrane of engineered *E. coli* strain. When signal molecule thiosulfate exists, regulatory protein ThsR will be phosphorylated. The promoter PphsA will be activated, starting the expression of reporter gene (e.g. *sfgfp*), producing sfGFP.

(B) TtrS expresses constitutively, and the expressed sensor protein will be incorporated into cell membrane of engineered *E. coli* strain. When signal molecule tetrathionate exists, regulatory protein TtrR will be phosphorylated. The promoter Pptrb185-269 will be activated, starting the expression of reporter gene (e.g. *sfgfp*), producing sfGFP.

选用实验室常用的分子克隆菌株 *E. coli* Top10 作为底盘生物, 使用流式细胞仪定量测试硫代硫酸盐检测系统对硫代硫酸盐浓度梯度的响应结果如下图所示:

### 3.2 报告基因的改进

考虑到实际应用中需要观察粪便的颜色来判断肠道健康情况, 而肠道的无氧环境不利于 GFP 蛋白成熟和发出荧光<sup>[7]</sup>。此外, 观察 GFP 的颜色



需要用紫外线激发, 实际应用中需要额外的设备可能带来不便。

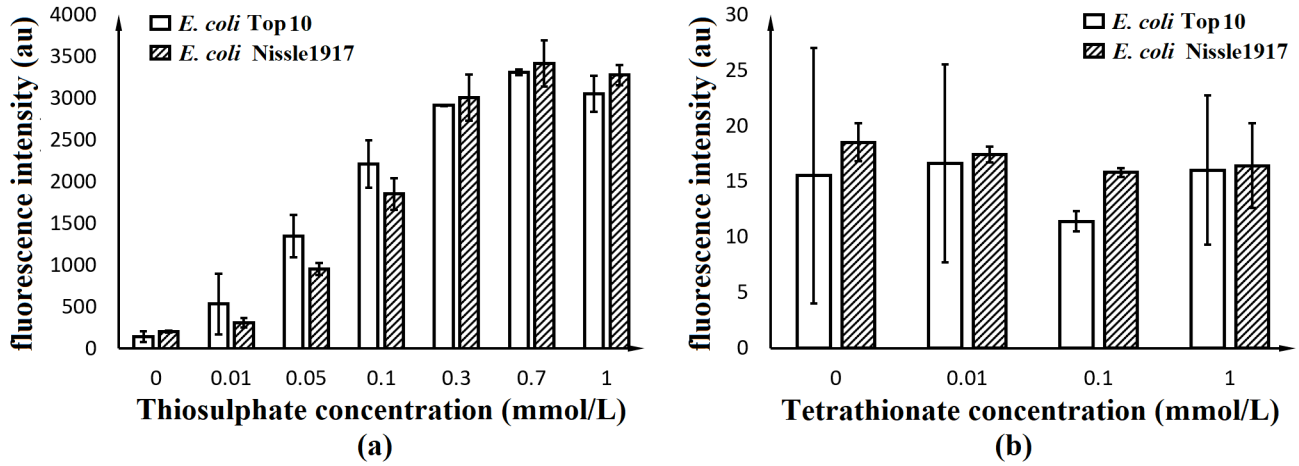


图2 以 *sfgfp* 为报告基因 ThsSR(A)和 TtrSR(B)分别在 *E. coli* Top 10 和 *E. coli* Nissle 1917 中, 对硫代硫酸盐(A)和四硫酸盐(B)浓度梯度的响应曲线

Fig. 2 Response curve of ThsSR (a) and TtrSR (b) to thiosulfate (a) and tetrathionate (b) concentration gradient in *E. coli* Top10 and *E. coli* Nissle 1917, while using *sfgfp* as reporter gene.

(a) *E. coli*'s fluorescence intensity (mean±se, n=3) increases among thiosulfate concentration gradient. Showing a good potential of the ThsSR system in both *E. coli* Top10 and *E. coli* Nissle 1917 to be used as bio-detector for intestinal inflammation.

(b) *E. coli*'s fluorescence intensity (mean±se, n=3) remains low and showed on response to tetrathionate concentration gradient. Meaning the TtrSR detection system needs to be revised and improved in both *E. coli* Top10 and *E. coli* Nissle 1917.

我们决定使用可以直接肉眼观测颜色的色素蛋白基因来替换 *sfgfp*, 作为肠道炎症的报告基因。为了选出使粪便变色最显著的色素蛋白, 我们使用有着类似于粪便颜色的咖喱模拟粪便来与色素蛋

白混合, 将表达色素蛋白的大肠杆菌 (LB 培养基 50 mL, 200 r/min 37 °C 培养过夜) 混入 5 g 模拟粪便并搅拌均匀后的结果如下图 3 所示。

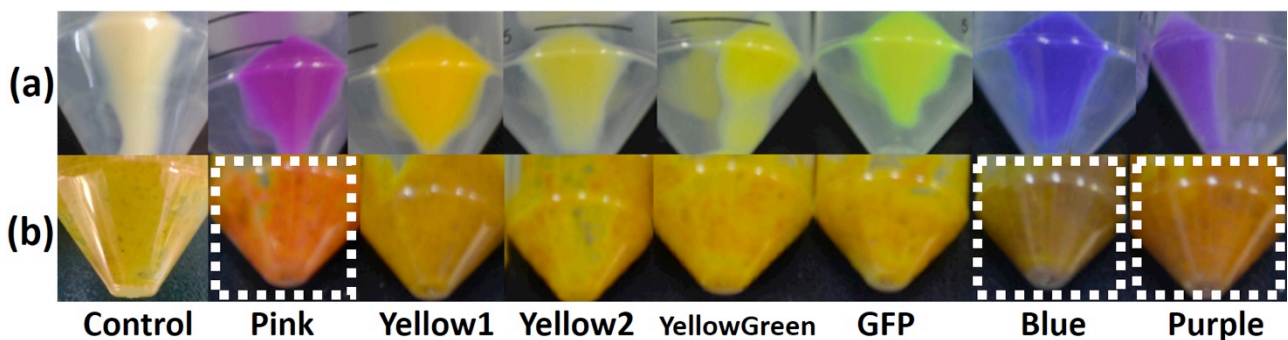


图3 色素蛋白与模拟粪便混合带来颜色变化的定性结果

Fig. 3 Qualitative results for color change of simulated feces mixed with chromoproteins

(a): The color of genetically engineered (pSEVA321 plasmid skeleton + strong promoter + strong RBS + corresponding



chromoprotein genes) *E. coli* Top10 pellets collected through centrifugation. The control group bacteria were also transformed by pSEVA321 plasmid.

(b): The *E. coli* Top10 pellets collected in Fig3(a) were then mixed with mimic feces. It could be seen that, pink (spisPink, Part: BBa\_K1033932<sup>[8]</sup>), blue (amilBlue, Part:BBa\_K592009<sup>[9]</sup>) and purple (gfasPurple, Part:BBa\_K1033919<sup>[10]</sup>) chromoproteins changed the color most obviously to naked human eye. These three chromoproteins were then chosen as reporters for subsequent experiments.

### 3.3 新系统的构建

测试过这些色素蛋白在模拟大便中的变色效果后, 我们将变色最明显三种色素蛋白基因片段 *gfasPurple*、*spisPink*、*amilCP*, 分别转入到了 ThsSR 和 TtrSR 系统中。此外, 我们还测试了另一种墨绿

色的色素分子紫色杆菌素前体(proviolaceinic acid, BBa\_K274003<sup>[11]</sup>)作为报告基因的可能性。该色素分子也呈现出非常明显的颜色, 并且可以经由微生物进一步加工后变为紫色杆菌素, 对肠道炎症有潜在的治疗效果<sup>[12]</sup>

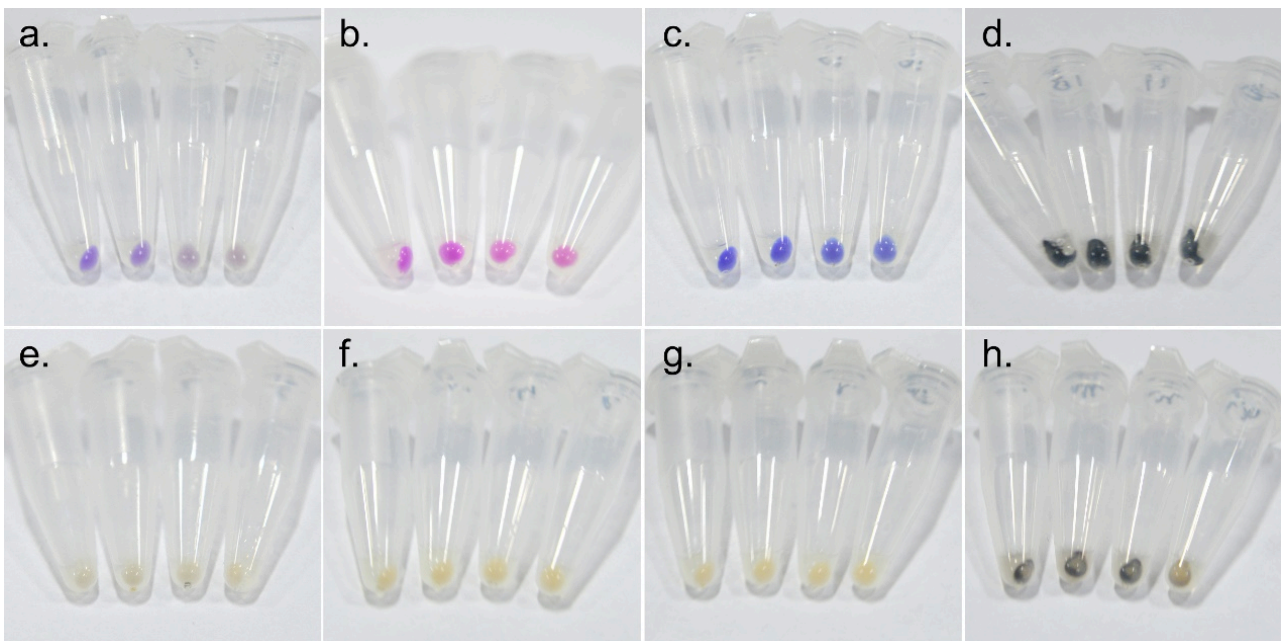


图 4: 以不同的色素蛋白或其他有色化学物质作为报告基因时, ThsSR 和 TtrSR 系统对诱导化学物的响应

Fig. 4 Response of ThsSR or TtrSR system to the inducing chemicals, featuring different chromoproteins or other colored chemicals as reporter gene.

(a-d): Response to thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) of the ThsSR system, in each image (a)-(d), from left to right, the concentration of thiosulfate is: 1.0 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0 mmol/L. For chromoprotein GfasPurple(a) and SpisPink(b), the response level could be distinguished among different inducing chemical concentration. For chromoprotein AmilBlue(c) and colored chemical proto-violacein(d), severe leaking expression makes the result undistinguishable.

(e-h): Response to tetrathionate ( $\text{Na}_4\text{S}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) of TtrSR system, in each image (e)-(h), from left to right, the concentration of tetrathionate is: 2.5 mmol/L, 1.0 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0 mmol/L. When using chromoproteins as reporters (e, f, g), no obvious response can be seen from the results. However, while using proto-violacein as reporter gene, the response is clear and easy to be seen.

## 4 讨论

根据 Daeffler 和 Galley 等的论文, 过多的 TtrR 可能会导致 TtrSR 系统失效。在 Daeffler 等的论文中, 作者针对 TtrS 和 TtrR 选取了一系列的启动子在 *E. coli* Nissle 1917 中进行表征, 其中部分弱启动子体现出比较好的效果, 有 17–40 倍的响应范围, 然而当 TtrS 的启动子强度过大时, 一部分组合生长受到影响; 当 TtrR 的启动子强度过大时, 虽然生长没有受到影响, 但是响应却消失了。在本文的 TtrSR 系统中, 虽然 TtrR 的启动子和 Daeffler 等的论文一致 J231106, 但是质粒使用了高拷贝复制子 pMB1 (500–700 拷贝) 远远高于原文中的拷贝数 p15a (10–15 拷贝), 因此也出现了过多 TtrR。

而猜测导致这个现象的原因是, 双组分 TtrSR 系统中, TtrS 不仅能够磷酸化, 也能够去磷酸化 TtrR<sup>[13]</sup>。过多的磷酸化 TtrR 可能会间接促进自身的去磷酸化, 从而无法激活其下游对应启动子 *PttrB*。

肠道炎症检测器是用改造过的大肠杆菌检测肠道中的特定小分子并进行色素蛋白的表达, 色素蛋白可在人体肠道中降解, 对人体无害; 且相比于荧光蛋白, 色素蛋白不需要紫外线照射就可辨认, 适用于家庭环境下的应用。使用紫色杆菌素前体作为报告基因会带来更多潜在的好处, 例如该分子经过加工将形成紫色杆菌素并具有抗细菌、抗肿瘤、抗氧化等功能<sup>[12]</sup>, 是一种潜在的肠道炎症治疗药物, 这可能使生物检测器同时具备一定的治疗功能。

实验表明, ThsSR、TtrSR 这两种生物检测器系统在益生菌 *E. coli* Nissle 1917 中亦可工作, 这意味着将来可以考虑把含有这两种生物检测器的益生菌制成胶囊给人服用, 从而发挥检测和治疗的效应。在此基础上, 利用基因工程改造过的生物检测器可以与低功耗的无线电子设备结合, 实时监测人体内的生物信号<sup>[14]</sup>。

考虑到测试者在家庭环境中实际应用生物检测器诊断肠道炎症的场景, 接下来可能还有很多困难需要克服: 例如, 真实粪便的颜色可能与模拟粪便的颜色有区别, 可能还需要进一步实验, 以建立不同的比色标准。再如, 不同饮食习惯下的粪便颜色亦会有所不同, 很难保证在任何条件下色素蛋白和色素分子都清晰可见, 因此可能需要建议使用者

在服用生物检测器胶囊前后的一段时间内饮食尽量清淡, 或者与生物检测器配套提供某种标准化的餐食。

此外, 实验过程中发现紫色杆菌素前体分子易溶于水, 且产量较大, 变色效果非常明显 (图 5)。因此推断, 使用紫色杆菌素前体作为报告基因时, 粪便在厕所中静置一小段时间后, 厕所中水的颜色可能会为测试者提供更有效的判断依据。

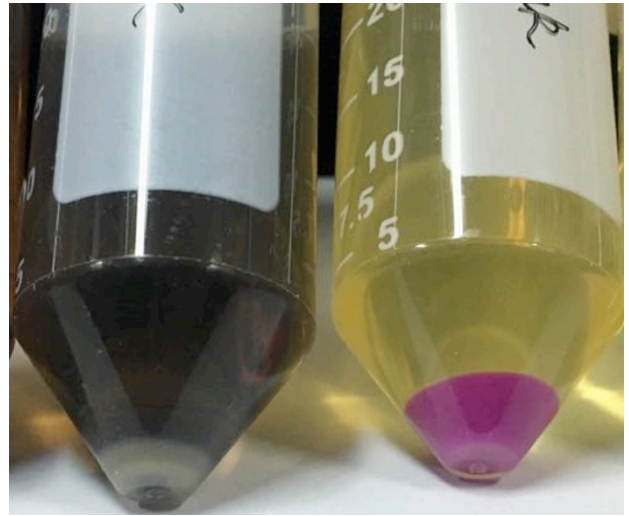


图 5: 紫色杆菌素前体对培养基的变色效果 (左图), 及其对照组 (spisPink, Part: BBa\_K1033932<sup>[7]</sup>) 效果 (右图)

Fig. 5 Color change to culture medium caused by proto-violacein (tube on left), whereas chromoprotein (spisPink, Part: BBa\_K1033932<sup>[7]</sup>) stayed in *E. coli* cell and did not change the color of culture medium (tube on right). We thus infer that, while using protoviolacein as a reporter, people could leave their feces in toilet for a while and get the testing results by reading toilet water.

## REFERENCES

- [1] Qian JM, Yang H. Current status and prospect of research of inflammatory bowel disease in China. *Chin J Inflamm Bowel Dis*, 2017, 1(1): 2–4 (in Chinese). (未找到本条文献英文信息, 请核对)  
钱家鸣, 杨红. 中国炎症性肠病研究现状和展望. *中华炎症肠病杂志*, 2017, 1(1): 2–4.
- [2] Blachier F, Davila AM, Mimoun S, et al. Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino Acids*, 2010, 39(2): 335–347.
- [3] Hildebrandt TM, Grieshaber MK. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J*, 2008, 275(13): 3352–3361.
- [4] Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 2010, 467(7314): 426–429.
- [5] Daeffler KNM, Galley JD, Sheth RU, et al. Engineering bacterial thiosulfate and tetrathionate sensors for detecting gut inflammation. *Mol Syst Biol*, 2017, 13(4): 923.
- [6] Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: Unit 15.25. (请核对页码)
- [7] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(26): 12501–12504.
- [8] Part: BBa\_K1033932. [2018-05-31]. [http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa\\_K1033932](http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K1033932).
- [9] Part: BBa\_K592009. [2018-05-31]. [http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa\\_K592009](http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K592009).
- [10] Part: BBa\_K1033919. [2018-05-31]. [http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa\\_K1033919](http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K1033919).
- [11] Part: BBa\_274003. [2018-05-31]. [http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa\\_K274003](http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K274003).
- [12] Sun HN, Zhao DD, Xiong B, et al. Engineering corynebacterium glutamicum for violacein hyper production. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 148.
- [13] Huynh TAN, Stewart V. Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol Microbiol*, 2011, 82(2): 275–286.
- [14] Mimee M, Nadeau P, Hayward A, et al. An ingestible bacterial-electronic system to monitor gastrointestinal health. *Science*, 2018, 360(6391): 915–918.