



Research
Synthetic Biology—Article

一种使用隔离子 RiboJ 测定绝对定量蛋白表达量的方法

余泓彬^{a,#}, 王铮^{a,c,#}, 许瀚月^a, 郭玖思^{a,c}, 马清格^{a,c}, 穆翔翎^{a,d}, 罗云孜^{a,b,*}

^a West China Medical Center Team for International Genetically Engineered Machine Competition 2017, West China School of Medicine / West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

^b Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University and Collaborative Innovation Center of Biotherapy, Chengdu 610041, China

^c West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

^d College of Physical Science and Technology, Sichuan University, Chengdu 610064, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2018

Revised 20 April 2018

Accepted 29 September 2018

Available online 09 October 2018

关键词

RiboJ

启动子测定

合成生物学

摘要

特定启动子的绝对定量蛋白表达量测定在分子生物学及合成生物学领域具有重要的意义。启动子强度一般由该启动子表达荧光蛋白的荧光强度表示。然而，对于特定启动子的绝对定量蛋白表达量测定方法目前仍不尽如人意。不同蛋白编码序列对启动子表达水平的影响及现有测定绝对定量蛋白表达量方法的复杂性，均为绝对定量蛋白表达量测定带来了挑战。我们在这里介绍了一种利用隔离子 RiboJ 和标准荧光曲线快速测定绝对定量蛋白表达量的方法，并通过模型对该方法进行了验证。使用这种方法，我们成功测定了 Anderson 启动子家族中 9 种组成型启动子的强度。本方法为代谢通路设计提供了更准确的数据，并为不同启动子强度的标准化提供了一种直接的方案。

© 2018 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

酶动力学公式显示，酶浓度及底物浓度在酶促反应中起着重要作用。为了提高已知底物浓度情况下人工代谢通路的效率，通路中每种酶的表达量需要被仔细考虑。一方面，酶的过量表达可能会造成细胞的额外负担；另一方面，酶表达量不足会造成代谢流效率低下。因此，应慎重选择启动子这一能影响酶绝对蛋白浓度的因素。然而，对于某一启动子绝对定量蛋白表达量的参数测定方法未见文献报道。启动子测定一般通过其表达荧

光蛋白的荧光强度或下游基因的 RT-PCR 结果描述 [1–6]，其仅能进行相对比较。然而，启动子绝对定量蛋白表达量的测定中仍有一些问题需要解决。基因的表达水平受蛋白编码序列的影响。这意味着仅仅依靠启动子下游的蛋白表达量测定启动子表达参数是不准确的 [7]。此外，通过蛋白质印迹法 (western blotting)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 等类似技术测定绝对定量蛋白表达量方法复杂且价格昂贵。

RiboJ 是一种能够自我切割的核酶，能够移除其上游 5' 端未翻译区域。在 Lou 等 [7] 发表的论文中显示，两

* Corresponding author.

E-mail address: luoyunzi@scu.edu.cn (Y. Luo)

These authors contributed equally to this work.

种不同绿色荧光蛋白 (GFP) 的变体 (sfGFP与cl-sfGFP融合蛋白) 表达不同。然而, 当他们将RiboJ序列添加于蛋白编码序列前时, 两种蛋白诱导曲线的相对表达量差异消失。这表明RiboJ可以作为一种隔离子使得一种启动子下的不同蛋白表达水平均质化, 从而可以在评价一种启动子时忽略蛋白编码序列。为快速简单评价一种启动子, 我们尝试通过确定绝对定量蛋白量与加强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, eGFP) 荧光量之间的关系, 并使用含有RiboJ设计的蛋白表达系统来确定启动子的强度。我们从一种广泛在国际基因工程机器 (international genetically engineered machine, iGEM) 竞赛中使用, 并已由红色荧光蛋白 (RFP) 及GFP描述过的大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) $\sigma 70$ 启动子库——Anderson启动子家族中选择了9个启动子进行测定[4,8]。本设计成功测定了这9种启动子, 并得到精确的数据用于后续通路设计, 为标准化不同强度启动子提供了一种直接的方法, 可用于任意组成型启动子的绝对定量蛋白表达量的测定。

2. 材料与方法

2.1. 质粒构建

pET28a-eGFP质粒由中国生物治疗国家重点实验室提供。eGFP基因来源于质粒pEGFP-N1, 连接入pET28a载体后含有6×His标签用于纯化。测定质粒源于标准生物部件登记处 (Registry of Standard Biological Parts) 中pSB1C3骨架的BBa_J364001模块。RiboJ通过寡核苷酸链 (北京擎科新业生物技术有限公司, 中国) 合成并通过Gibson组装无缝连接至Anderson启动子序列下游。随

表1 本研究中所使用的质粒

Plasmid name	Description
pJ23100	Measurement device containing promoter J23100
pJ23106	Measurement device containing promoter J23106
pJ23107	Measurement device containing promoter J23107
pJ23108	Measurement device containing promoter J23108
pJ23109	Measurement device containing promoter J23109
pJ23113	Measurement device containing promoter J23113
pJ23114	Measurement device containing promoter J23114
pJ23117	Measurement device containing promoter J23117
pET28a-eGFP	eGFP gene inserted into a pET28a plasmid for protein purification

后, GFP通过Gibson组装被替换为eGFP, 构成最终启动子为J23106的测定系统。其他不同启动子测定系统均通过寡核苷酸定点诱变 (KOD-Plus-Neo, TOYOBO Co., Ltd., Japan; DpnI, New England Biolabs Inc., USA) 构建。Anderson启动子家族的序列均记录在标准生物部件登记处中[8]。本实验中所用到的质粒已在表1中列出。测定系统的基因结构显示于图1中, 具体序列在Appendix A (Table S1) 中有详细记录。

2.2. eGFP 的纯化

将蛋白表达质粒 (pET28a-eGFP) 转化入*E. coli* BL21 (DE3)。转化后的工程菌在含有浓度为 $34 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡拉霉素的1 L LB (lysogeny broth) 培养基中, 于 37°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速条件下过夜培养。当OD600达到0.6~0.8时, 添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 进行诱导, 使其在培养液中终浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 16°C 培养18 h后, 将培养液于 4°C 及 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速条件下离心10 min。收获的细胞在40 mL裂解液 (PBS缓冲液, $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 及 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , pH值为7.5) 中重悬, 并通过高压均质机 (广州聚能纳米生物科技股份有限公司, 中国) 进行裂解。将裂解液进行离心 (4°C , $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min; Thermo F21-8x50y rotor)。收集上清液加入 4°C 裂解液预平衡后的Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) 柱中。用3~5倍柱体积 (CV) 的冲洗液 (PBS缓冲液, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑) 冲洗柱3次, 再用3~5倍柱体积的溶解液 (PBS缓冲液, $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑) 冲洗柱3次。将含有eGFP的溶解液于15 mL的浓缩器 (Amicon® Ultra-15, Merk Millipore, USA) 中浓缩, 并使用Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Conglomerate, USA) 进行分子筛处理。分子筛过程仅显示有eGFP一个蛋白峰。收集该蛋白峰出现时的蛋白并浓缩至 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

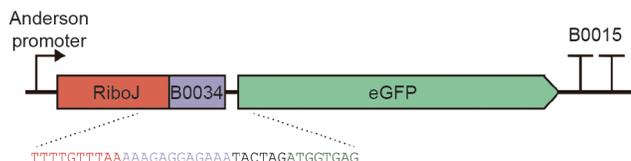


图1. 测定系统的基因结构。图中展示了测定系统的详细基因结构。在Anderson启动子和隔离子RiboJ间无其他序列。图中展示了部分详细基因序列, 其颜色与所属部分元件颜色一致。B0034是一种核糖体结合位点, B0015是一种双终止子元件, 其描述和序列都可在标准生物部件登记处中查询。

对部分蛋白立刻进行分析，其余部分使用液氮冷藏并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。我们重复了5次纯化实验，获取了5批次纯化后的eGFP用于后续研究。

2.3. eGFP 稳定性测试

我们在蛋白纯化后立即测定了每一批eGFP的荧光强度以排除荧光猝灭的影响。eGFP样品在测定前放置于用锡纸包裹好的黑底96孔板中，随后使用四川大学华西药学院的SparkTM 10M 酶标仪 (Tecan Group Ltd., Switzerland) 进行测定。测定时荧光激发波长为450 nm，发射波长为490 nm。纯化后的eGFP绝对蛋白浓度使用BCA Protein Assay Kit[生工生物工程（上海）股份有限公司，中国]进行测定。本实验重复了5次以测试其重复性。

第一批纯化的eGFP储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境。在第4、8、12及16天时，我们对该批蛋白的荧光强度及绝对蛋白浓度进行了重复测定，以测试eGFP的稳定性及荧光猝灭随保存时间变化的影响。

2.4. 细胞密度及荧光测定

我们的测定步骤很大程度上参考了iGEM InterLab的研究[9]。所有的测定系统质粒均转入*E. coli* BL21 (DE3) 中进行后续实验。转化后的工程菌于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速条件下，接种至含有 $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素的5 mL LB 培养基中过夜培养。每种测定系统至少选择了3个克隆进行测定。在50 mL培养管中加入12 mL含有 $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素的LB培养基，加入培养过夜的菌液使得培养基目标OD₆₀₀值为0.02。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速条件下培养16~18 h后，每管取3次500 μL 样品准备进行测定。细胞密度 (OD₆₀₀) 于600 nm波长进行测定，细菌的荧光强度在激发波长450 nm、发射波长490 nm (SparkTM 10M, Tecan Group Ltd., Switzerland) 下进行测定。

2.5. 建模与数据分析

这一部分首先讨论蛋白质生成与启动子强度之间的关系[10,11]。每个细胞eGFP mRNA的生成速率 (M_{eGFP}) 与质粒拷贝数 (n)、启动子强度 (PoPs) 和mRNA降解速率 ($\gamma_{M_{\text{eGFP}}}$) 相关，如式 (1) 所示。每个细胞中未成熟eGFP的量 (I_{eGFP}) 依赖于未成熟eGFP翻译速率 ($k_{\text{tr}}^{\text{eGFP}}$)、成熟eGFP降解速率 ($\gamma_{I_{\text{eGFP}}}$) 和成熟eGFP翻译速率 ($k_{\text{m}}^{\text{eGFP}}$)，其关系可用式 (2) 表示。每个细胞中的成熟eGFP含量

(P_{eGFP}) 也受成熟eGFP降解速率 ($\gamma_{P_{\text{eGFP}}}$) 的影响，如式 (3) 所示。

$$\frac{dM_{\text{eGFP}}}{dt} = n\text{PoPs} - \gamma_{M_{\text{eGFP}}} M_{\text{eGFP}} \quad (1)$$

$$\frac{dI_{\text{eGFP}}}{dt} = k_{\text{tr}}^{\text{eGFP}} M_{\text{eGFP}} - \gamma_{I_{\text{eGFP}}} I_{\text{eGFP}} - k_{\text{m}}^{\text{eGFP}} I_{\text{eGFP}} \quad (2)$$

$$\frac{dP_{\text{eGFP}}}{dt} = k_{\text{m}}^{\text{eGFP}} I_{\text{eGFP}} - \gamma_{P_{\text{eGFP}}} P_{\text{eGFP}} \quad (3)$$

用Mathematica (Wolfram Research, USA) 解以上公式：

$$P_{\text{eGFP}} = f(n, \gamma_{M_{\text{eGFP}}}, k_{\text{tr}}^{\text{eGFP}}, \gamma_{I_{\text{eGFP}}}, k_{\text{m}}^{\text{eGFP}}, \gamma_{P_{\text{eGFP}}}, t) \times \text{PoPs} \quad (4)$$

式中， f 是一个关于 $\gamma_{M_{\text{eGFP}}}$ 、 $\gamma_{I_{\text{eGFP}}}$ 、 $\gamma_{P_{\text{eGFP}}}$ 、 $k_{\text{tr}}^{\text{eGFP}}$ 、 $k_{\text{m}}^{\text{eGFP}}$ 、 n 和 t 的函数。对于一种启动子来说，我们视 $\gamma_{M_{\text{eGFP}}}$ 、 $\gamma_{I_{\text{eGFP}}}$ 等为常数，以 A 表示。接下来，在利用线性回归分析荧光强度数据后，可得到eGFP浓度 (C_{eGFP}) 和荧光强度 (F) 之间的系数 (k)。

$$C_{\text{eGFP}} = kF \quad (5)$$

最后，通过一系列实验获得荧光强度和蛋白浓度之间的关系，得出启动子的范围。eGFP的摩尔浓度 (M_{reGFP}) 可由下式表示，其大小为31 534.35 Da：

$$C_{\text{meGFP}} = \frac{C_{\text{eGFP}}}{M_{\text{reGFP}}} \quad (6)$$

$$C_{\text{cell}} = \text{OD}/\varepsilon \quad (7)$$

式中，当 C_{meGFP} 为1 mol eGFP时， C_{eGFP} 即为eGFP浓度； C_{cell} 是细胞浓度； ε 是一个值为 8×10^8 的常数[12]。因此，启动子强度 A 可以下式表达：

$$A = \frac{k\varepsilon F}{M_{\text{reGFP}}\text{OD}} \quad (8)$$

N 是选择的单克隆数。我们对每个克隆测定了荧光强度和OD值 M 次，并测定了对照组 (LB培养基) 荧光强度和OD值 Q 次。可以下式表达：

$$A = \frac{k\varepsilon}{M_{\text{reGFP}}} \times \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \frac{\frac{1}{M} \sum_{m=1}^M F_{nm} - \frac{1}{Q} \sum_{q=1}^Q F_{nq}^{\text{LB}}}{\frac{1}{M} \sum_{m=1}^M \text{OD}_{nm} - \frac{1}{Q} \sum_{q=1}^Q \text{OD}_{nq}^{\text{LB}}} \quad (9)$$

3. 结果

3.1. eGFP 的纯化结果

我们成功获得了纯化的eGFP。样品的分子层析结

果仅显示一条单峰[图2 (a)]。样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 后显示有一条约30 kDa的蛋白带[图2 (b)], 其大小与预测的重组蛋白大小吻合。

3.2. eGFP 稳定性测试

通过线性回归分析了5次eGFP纯化后立即测定的实验结果。我们发现在实验范围内, 荧光强度 (F) 和BCA法测定的绝对蛋白浓度 (C) 间存在强线性关系 ($r^2 = 0.9733$, 图3)。结果显示实验具有良好的重复性。

接下来, 我们收集了所有荧光猝灭实验的数据, 如图4所示。该图由16 d数据进行线性回归所得。结果

显示eGFP荧光强度和eGFP浓度间有强线性关系 ($r^2 = 0.9936$)。不同时间测定后依然为强线性关系, 说明纯化后的eGFP稳定性高, 可忽略荧光猝灭随时间变化所受的影响。

3.3. 数据分析

在使用测定系统按上述方法测定 OD_{600} 和荧光强度后, 收集相应数据并计算。原始测定数据已附在Appendix A (Table S2与S3) 中。绝对定量蛋白表达量和相对强度如表2与图5所示。

值得注意的是, 启动子的时间不变性可通过建模数据证明。根据表2、式(4)及实验结果, 蛋白生成速率可被确定, 如图6所示。不同时间、不同启动子的积累

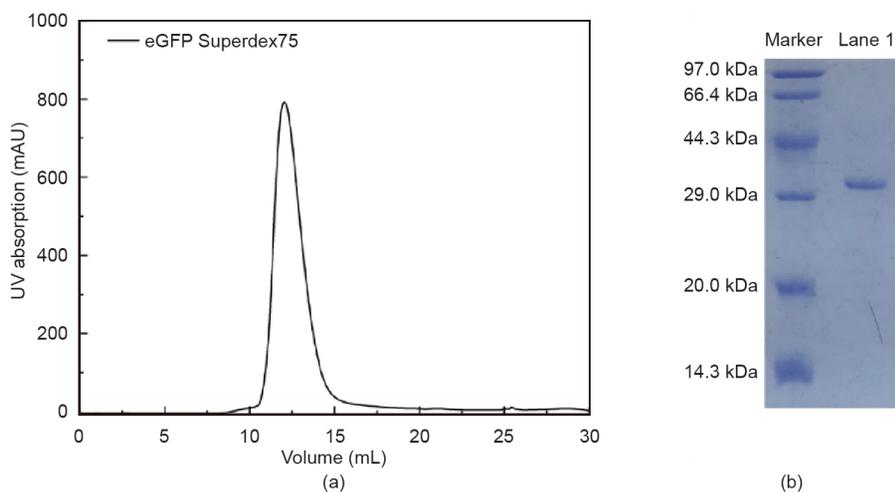


图2. (a) eGFP分子筛过滤结果; (b) SDS-PAGE结果显示泳道1中存在纯化后的eGFP (31.5 kDa)。该蛋白是由含pET28a-eGFP的*E. coli* BL21 (DE3) 表达后纯化得到的。

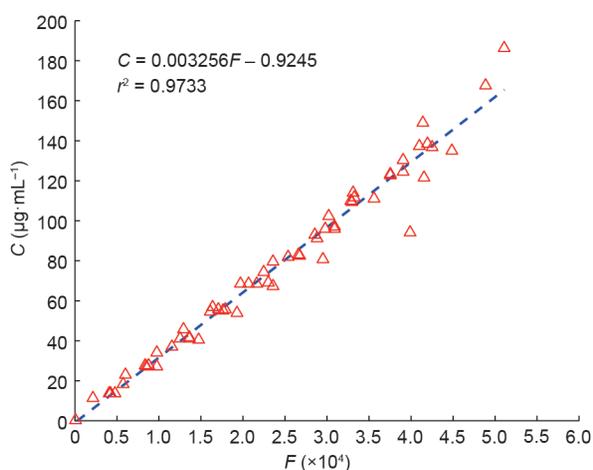


图3. 在450/490 nm条件下测得的荧光强度与绝对蛋白浓度间存在着线性关系。本图包含5次独立实验结果后的数据, 且表现出了良好的线性关系, 说明本实验具有良好的重复性。

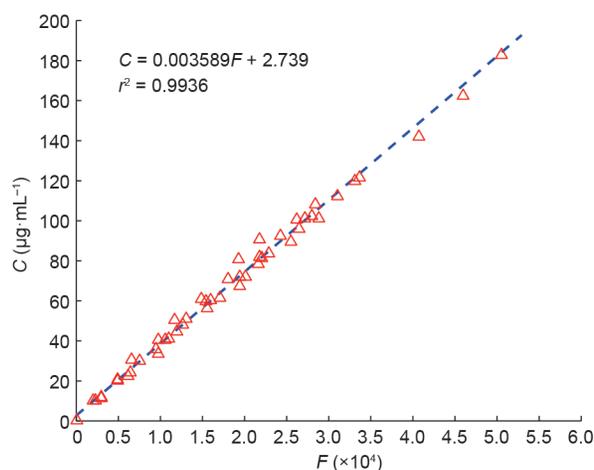


图4. 在450/490 nm条件下测得的荧光强度与绝对蛋白浓度间存在着线性关系。本图包含连续测定实验中的所有数据, 结果显示出了强线性关系。

蛋白表达比例是相同的。图6 (b)~(d) 基于实验结果,展示了不同时间的蛋白表达量。

4. 讨论

绝对定量蛋白浓度对通路的定量构建有重要的作用,其目前很少被报道。本文所使用的启动子强度定量

表2 所测定启动子的绝对定量蛋白表达量和相对强度

Promoter	Absolute protein expression quantity ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Relative activity
J23100	1.893 ± 0.070	1.000
J23106	1.344 ± 0.062	0.710
J23107	0.464 ± 0.011	0.244
J23108	0.875 ± 0.138	0.462
J23109	0.237 ± 0.010	0.125
J23113	0.227 ± 0.009	0.120
J23114	0.200 ± 0.006	0.106
J23117	0.160 ± 0.005	0.085

^a The J23100 result was set at 1 for relative activity comparison.

测定结果对启动子选择具有实用价值。为了说明该结果的实用价值,我们选择了一个3种酶参与的代谢通路以举例说明。

我们设 $[E_t]$ 为酶的总浓度; $[E]$ 为酶的浓度; $[S]$ 为底物浓度; $[ES]$ 为酶-底物中间复合体; $[P]$ 为产物浓度;

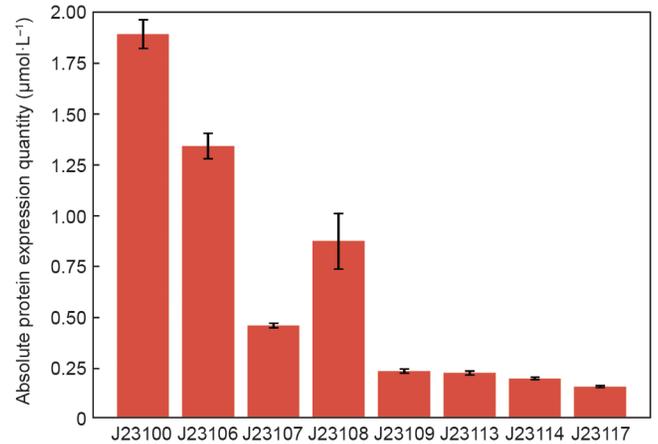
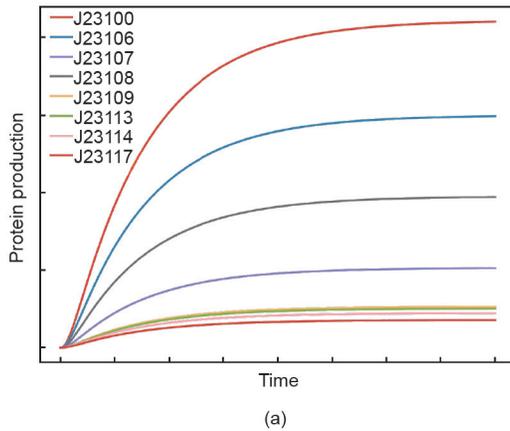
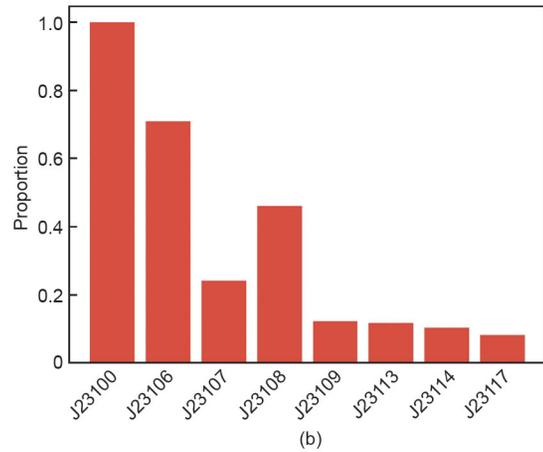


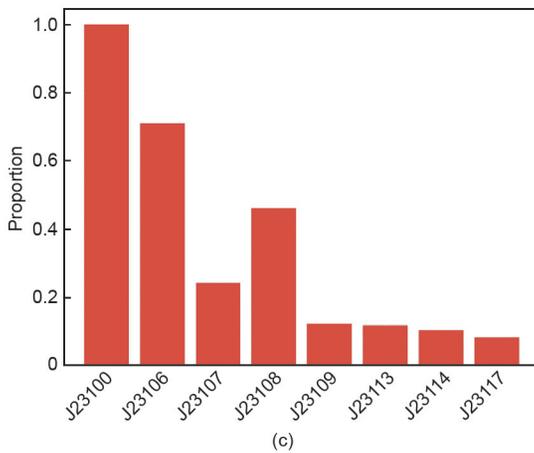
图5. 被测定的绝对定量蛋白表达量。



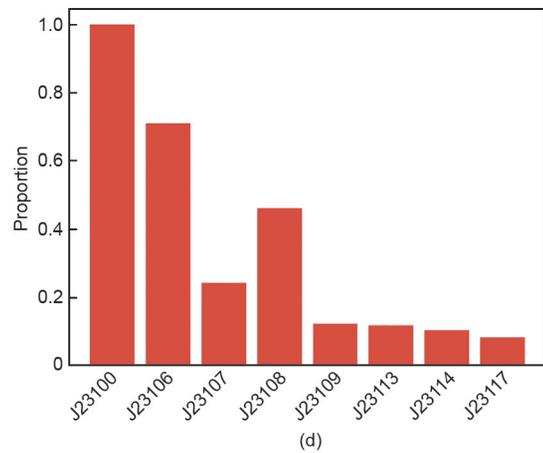
(a)



(b)



(c)

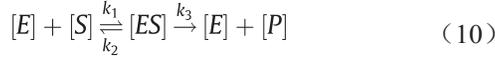


(d)

图6. (a) 启动子时间不变性特征的建模结果; (b) 在反应进行至四分之一时表达蛋白的比例; (c) 在反应进行至一半时表达蛋白的比例; (d) 在反应结束时表达蛋白的比例; (b)~(d) 中的柱高代表每种启动子表达蛋白占启动子J23100所表达蛋白的比例。

k_1 为第一步反应正向平衡系数； k_2 为第一步反应逆向平衡系数； k_3 为第二步反应正向平衡系数[13]。

化学式如下：



假设每一步都已达到平衡，则 $[ES]$ 的生成和降解速率亦达到平衡。

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (11)$$

将公式变形：

$$\frac{([E_t] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (12)$$

假设

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (13)$$

$$v = k_3[ES] \quad (14)$$

式(12)变为：

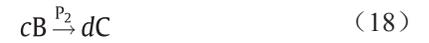
$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]} \quad (15)$$

$$v = \frac{k_3[S]}{K_M + [S]} [E_t] \quad (16)$$

值得注意的是， $[P]$ 及 $[E]$ 均被消除了。但 $[P]$ 会影响平衡，进而影响酶促反应生成率。因此随时间变化，式(16)可能变得更不精确。尽管如此，本公式仍能总体反映该过程。

假设在通路中，由物质A转化为物质C包括两步需

要酶 P_1 和 P_2 的反应：



这两步反应的速率可用 v_1 及 v_2 表示，物质A、物质B和物质C的浓度用 $[A]$ 、 $[B]$ 和 $[C]$ 表示。

在不考虑自发降解的情况下，一种产物（A、B或C）的反应速率等于其生成速率减去消耗速率。假设每种反应的比例为1:1。

$$\frac{d[A]}{dt} = -v_1 \quad (19)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -v_2 + \frac{b}{a} v_1 \quad (20)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = \frac{d}{c} v_2 \quad (21)$$

无论是一级反应还是零级反应，在酶的性质和初始底物浓度确定的情况下，速率仅由酶的浓度决定[如式(15)所示]。很明显，在底物充足的情况下，酶浓度越大，酶促反应越快。如不同反应间酶的最大反应速率($V_{\max} = k_{\text{cat}} [E_t]$)相差过大，则其中的一种产物则会不足，限制代谢速率。因此，多酶反应需考虑调节不同步骤间反应的关系(图7)。

如果 V_{\max} 能够相互匹配，产物则不会被积累(图8)。而必须选择合适的启动子以使不同步骤中的 V_{\max} 相等。本文所提出的启动子测定方法正是基于该理论基础。在获得了某一启动子的绝对定量蛋白表达量后，则能够精

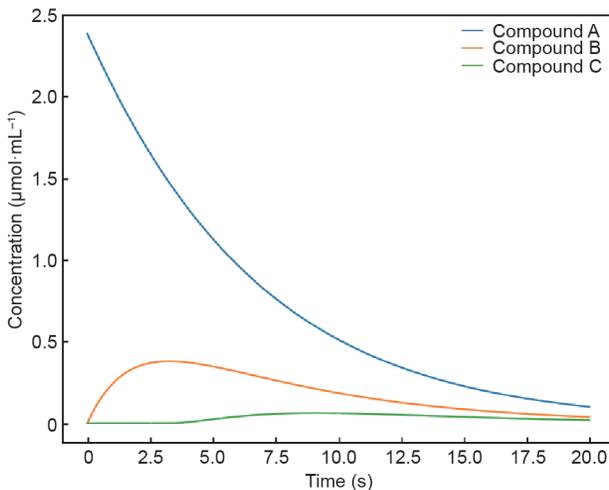


图7. 物质浓度随时间的变化情况。3步反应的 V_{\max} 比为1:5:29。

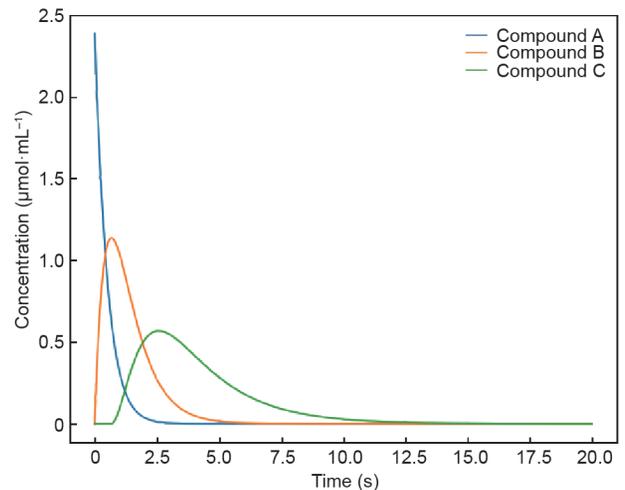


图8. 物质浓度随时间的变化情况。3步反应的 V_{\max} 比为1:2:2。

确地计算蛋白浓度 (C_{eGFP}), 即反应中的 $[E]$ 。

建模结果表明 $[E]$ 在代谢通路的构建中起到了关键的作用。本研究中介绍了一种新型、快速的绝对定量蛋白浓度测定方法以供后续研究。同时, 我们获得的启动子数据和相应的基因结构也可以在今后直接用于代谢通路的构建。

此外, 文中提供了一种通过绝对定量蛋白表达量这一通用指标直接标准化不同启动子的方法。我们介绍了这一标准化方法和 RiboJ 设计, 以鼓励研究者使用可通用比较的数据 (如绝对定量蛋白表达量) 进行启动子描述, 并且使用隔离子 RiboJ 提升不同研究中的基因线路的可重复性和可移植性。而且本研究还发现, 标准生物部件登记处中使用 RFP 荧光强度测定的启动子相对强度的排名和我们的测定结果并不完全相同 [14]。这样的差异可能是由于 RiboJ 的设计造成的, 因为其也能明显地影响基因表达量 [7, 15]。我们的测定结果和基因设计为未来通路构建提供了更高的精度。

5. 结论

本研究介绍了一种测定某一特定启动子绝对定量蛋白表达量的新方法。我们利用该方法成功测定了 Anderson 启动子家族中的 9 个组成型启动子, 并发现其与之前单纯使用荧光强度表征的启动子强度的测定结果并不完全相同。我们的方法为代谢通路设计提供了更准确的数据, 并为不同启动子强度的标准化提供了一种直接的方案。

致谢

本工作由中央高校基本科研业务费专项资金、国家自然科学基金 (项目编号: 81502966)、国家级大学生创新创业训练计划 (项目编号: 201710611744) 资助。感谢生物治疗国家重点实验室的罗云孜老师、苏丹老师、刘化一、王丽苹、陈义平给予的帮助; 感谢 2017 年国际基因工程机器竞赛华西医学队的其他成员, 尤其是

郭文和钟逸凡的帮助; 感谢华西临床医学院、华西医院及生物治疗国家重点实验室给予的支持; 感谢 iGEM 基金会为我们提供的机会。

Compliance with ethics guidelines

Hongbin Yu, Zheng Wang, Hanyue Xu, Jiusi Guo, Qingge Ma, Xiangxu Mu, and Yunzi Luo declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.09.012>.

References

- [1] Maeda M, Shimada T, Ishihama A. Strength and regulation of seven rRNA promoters in *Escherichia coli*. PLoS ONE 2015;10(12):e0144697.
- [2] Rudge TJ, Brown JR, Federici F, Dalchau N, Phillips A, Ajioka JW, et al. Characterization of intrinsic properties of promoters. ACS Synth Biol 2016;5(1):89–98.
- [3] Pedraza JM, Van Oudenaarden A. Noise propagation in gene networks. Science 2005;307(5717):1965–9.
- [4] Chappell J, Freemont P. *In vivo* and *in vitro* characterization of r70 constitutive promoters by real-time PCR and fluorescent measurements. In: Polizzi KM, Kontoravdi C, editors. Synthetic biology, 1073. Totowa: Humana Press; 2013. p. 61–74.
- [5] Kelly JR, Rubin AJ, Davis JH, Ajo-Franklin CM, Cumbers J, Czar MJ, et al. Measuring the activity of BioBrick promoters using an *in vivo* reference standard. J Biol Eng 2009;3(1):4.
- [6] Luo Y, Zhang L, Barton KW, Zhao H. Systematic identification of a panel of strong constitutive promoters from *Streptomyces albus*. ACS Synth Biol 2015;4(9):1001–10.
- [7] Lou C, Stanton B, Chen Y, Munsky B, Voigt CA. Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context. Nat Biotechnol 2012;30(11):1137–42.
- [8] Anderson JC. Anderson promoter collection [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 6]. Available from: <http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>.
- [9] Beal J, Haddock-Angelli T, Gershater M, De Mora K, Lizarazo M, Hollenhorst J, et al. Reproducibility of fluorescent expression from engineered biological constructs in *E. coli*. PLoS One 2016;11(3):e0150182.
- [10] Song K. Introduction to synthetic biology. Beijing: Science Press; 2010. Chinese.
- [11] Deft TU. Modeling [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 6]. Available from: http://2015.igem.org/Team:TU_Delft/Modeling.
- [12] Agilent. *E. coli* cell culture concentration from OD600 calculator [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 6]. Available from: <https://www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp>.
- [13] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, editors. Biochemistry: a short course. New York: W. H. Freeman and Company; 2012.
- [14] Anderson JC. Strength of Anderson Promoter [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 6]. Available from: http://parts.igem.org/wiki/index.php/Part:BBa_J23100.
- [15] William and Mary Team. RiboJ [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 19]. Available from: http://2016.igem.org/Team:William_and_Mary/RiboJ.