

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-027

合成生物学自动化装置 iBioFoundry 的构建与应用

卢挥¹, 张芳丽¹, 黄磊^{1,2}

(¹ 浙江大学杭州国际科创中心, 杭州 浙江 311215; ² 浙江大学生物工程研究所, 化学工程与生物工程学院, 浙江杭州 310058)

摘要: 合成生物学是一门关于设计、改造和重新合成生命的交叉融合性学科。它以工程化理念对生物体进行有目标的设计、改造, 使其拥有满足人类需求的生物功能, 甚至创造新的“人造生命”。由于生命体的高度复杂性, 为达预定目标往往需要进行大量人工试错性实验, 导致研究成本高、进展缓慢。随着自动化合成生物技术的不断发展, 目前全球各地有多个合成生物自动化设施已建成或在建中。本文从建设背景、设计构建、科研项目运行和应用前景等方面对浙江大学杭州国际科创中心建设的合成生物学自动化装置 iBioFoundry 进行介绍, 通过大肠杆菌工程菌的批量构建和酶的定向进化及筛选案例对实验自动化方案制定、实验流程程序编写和上机运行的过程做简要描述和分析, 并就装置耗材存储空间的分配、多实验任务并行和实验流程标准化建设等装置建设过程的一些思考做经验分享。合成生物学自动化装置可以帮助研究人员大幅提高实验效率, 装置产生的大量高质量数据结合信息技术, 有望高通量、低成本、多循环地实现合成生物学研究中“设计-构建-测试-学习”的自动化运行, 加速合成生物学在基础及诸多应用领域的研究效率。

关键词: 合成生物学; 生物铸造厂; 自动化平台; 标准化实验流程

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Establishment of iBioFoundry for synthetic biology applications

LU Hui¹, ZHANG Fangli¹, HUANG Lei^{1,2}

(¹ZJU-Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center, Zhejiang University, Hangzhou 311215, Zhejiang, China; ²Institute of Bioengineering, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: Synthetic biology is an interdisciplinary field that focuses on designing, modifying, and synthesizing biosystems. It uses engineering principles to design and modify biosystems and even create novel "artificial life" to provide biological functions that meet human needs. Due to the high complexity of biosystems, extensive trial and error experiments are often required to gradually realize the desired engineering goals, resulting in high research costs and slow progress. With the continuous development of automated synthetic biology technology, multiple automated

收稿日期: 2023-03-31 修回日期: 2023-05-24

引用本文: 卢挥, 张芳丽, 黄磊. 合成生物学自动化装置 iBioFoundry 的构建与应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(5): 877-891

Citation: LU Hui, ZHANG Fangli, HUANG Lei. Establishment of iBioFoundry for synthetic biology applications [J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(5): 877-891

synthetic biology facilities have been established or are under construction worldwide. Biofoundry is an integrated automated scientific facility that combines the principles of intelligent manufacturing with the theoretical foundation of synthetic biology. It enables fast construction and testing of reprogrammed living organisms through the integration of intelligent and automated high-throughput devices. This article introduces the background, design, operation, and application aspects of iBioFoundry, an automated synthetic biology facility established at ZJU-Hangzhou Global Scientific and Technological Innovation Center. The iBioFoundry adopts a modular design concept and integrates various peripheral devices with three track-mounted robotic arms to build four functional modules: sample library, DNA assembly, cell screening and cultivation, and analysis. To meet the requirements of different research tasks and maximize the utilization of the device, iBioFoundry has a multi-task process management function, which is able to track and record all the process handling information of the entire experimental process and achieve traceability of all samples. Through a brief description and analysis of the high throughput construction of engineered *E. coli* strains and the enzyme directed evolution and screening, the article discusses the formulation of experimental automation schemes, programming of experimental processes, and on-machine operation. The article also shares some thoughts on the allocation of consumable storage space, parallel execution of multiple experimental tasks, and standardization of experimental processes. Automated synthetic biology facilities can help researchers significantly improve experimental efficiency. By combining the large amount of high-quality data generated by the facility with information technology, the automated "design-build-test-learn (DBTL)" engineering cycle in synthetic biology research can be achieved in a high-throughput, low-cost, and multi-cycle manner, accelerating the research efficiency of synthetic biology in both fundamental and many biotechnological application fields.

Functional modules

- Sample library
- DNA assembly
- Cell screening and cultivation
- Analysis

Advantages

- Intelligent analysis and judgement
- Dynamic process and consumables management
- Multi-task parallel running
- Complete information record
- Easy and intuitive error recovery



Operation process

- Establishing experimental methods
- Programming experimental processes
- Automation test and debugging
- Developing automation schemes
- Running experiments and processing data

Applications

- Bio-component engineering
- Genome engineering
- Protein engineering
- Metabolic engineering
- Systems biology
-

Keywords: synthetic biology; biofoundry; automation platform; standardized experimental process

合成生物学是一个汇聚了生命科学、工程学和信息科学等诸多学科的新兴交叉学科，是现代生物学最具发展潜力的研究领域之一^[1-2]。继“DNA双螺旋发现”和“人类基因组测序”之后，合成生物学被誉为第三次生物技术革命^[3]。合成

生物学将正向工程学“自下而上”的“建造”理念与系统生物学“自上而下”的“分析”理念相结合，对生物体进行有目标的设计、改造乃至重新合成，创建赋予非自然功能的“人造生命”^[4]。研究过程涉及对大量基因元件、线路和系统的合

成与调试,需要对细胞进行“重编程”以实现特定功能^[5]。因生命体是复杂的高维度非线性系统,人们对其有限的理解使得人工设计的基因线路往往难以达到预期的工作效果,而目前反复的人工试错实验模式也导致新的人工生命的研发周期长、失败率高^[6-8]。自动化合成生物技术的发展结合标准化实验策略,高通量、低成本、多循环地完成“设计-构建-测试”闭环,将有助于大幅度提高合成生物学的研究效率^[9-10]。

自动化生物铸造厂(BioFoundry)是一种集成式的自动化科学设施,把自动化工业的智能制造理念与合成生物学理论基础相结合,通过智能化、自动化的高通量设备,实现对“重编程”生命体的快速构建和测试^[11-12]。目前,已有多个将BioFoundry用于支撑合成生物学相关研究和应用的案例,展现了BioFoundry在提升实验通量、降低实验成本、快速积累大量数据和提高研究效率等多方面的优势。美国伊利诺伊大学香槟分校的iBioFAB平台开发了酿酒酵母基因组定向进化的全自动操作方法,并用于提高乙酸耐受性能的高通量筛选,实验效率是手工操作的10倍以上^[13]。iBioFAB每天还可以构建约1000个定制化的TALEN,成功率在96%以上,平均构建成本小于3美元,大约是人工操作成本的0.3%^[14]。英国爱丁堡大学的EGF每周可以完成超过2000个DNA组装反应,通量相当于研究人员手工操作的20倍^[15]。中国科学院天津工业生物技术研究所的自动化平台每天可以完成300~600个自动化单基因克隆,对复杂质粒的多模块化组装也达到100个/天的通量,组装正确率达到90%以上^[16]。2019年5月“全球合成生物设施联盟”(Global Biofoundry Alliance, GBA)在日本正式成立^[17],截止到目前GBA成员已经达到35个。GBA的成立促进了全球BioFoundry成员之间的沟通交流,促成各方标准实验程序、通用技术路线、数据模型和应用实例等资源的开放共享,有助于推动BioFoundry成员间的合作以共同应对和解决能源、健康、环境等全球性与社会性的问题^[18-21]。

浙江大学杭州国际科创中心是浙江大学和杭州市全面深化市校战略合作共建的重大科技创新平台。中心下属的生物与分子智造研究院利用浙

江大学的学科会聚和工程化优势,建设合成生物学自动化装置iBioFoundry,力争构建深度融合“BT+IT”的高能级合成生物学研究平台。合成生物学、自动化技术及机器学习的天然互补属性也使iBioFoundry成为实现“BT+IT”深度融合的理想载体。合成生物学的标准化和模块化特性是实现合成生物构建过程全流程自动化的理论基础;iBioFoundry的高效性、高通量性和高度可重复性保障了机器学习所需大量的高质量数据;而机器学习又可以指导合成生物元件和人工细胞的智能编程设计、自动化标准化构建和测试、生产过程的精确控制,从而大幅提高合成生物学的基础和应用研究效率^[22-23]。本文将从iBioFoundry的构建方案、科研项目开展、实验运行和建设经验等方面进行介绍。

1 iBioFoundry构建方案

生命体作为合成生物学的研究对象具有高度动态、调控灵活、非线性等特征,如何对其进行精准预测和设计是合成生物学面临的核心挑战。研究常需从“整体或系统”层面切入,对基因片段、代谢网络、调控网络,甚至是细胞整体进行人工设计与合成,实验工作量大、通量需求高。本方案希望通过整合自动化设备、智能化控制以及数据管理系统,构建一套合成生物学自动化装置,实现从生物样本存取、DNA元件组装、细胞筛选及培养到产物检测的全流程自动化操作,达到高通量实验标准化和高效率的目标。

1.1 设计思路

iBioFoundry采用模块化设计,利用轨道式机械臂整合各种外周设备,构建样本库、DNA元件组装、细胞筛选及培养、分析检测四大功能模块,实现合成生物学实验的自动化。装置整体设计具备开放性,台面布局相对宽松,后期可以通过设备的位移、层叠或添加,实现设备布局的灵活变动或装置功能的升级。根据不同模块的实验操作需求和特点,装置搭配使用工业级和协作式机械臂,从而兼具工业机械臂的高效率、高稳定性和

协作式机械臂操作灵活的特性。装置中机械臂可与所有外周设备直接交互，避免以往某些设计中个别设备需要通过移液工作站中转样本的情况，以此提高设备调用的灵活性。对于装置中经常需要进行耗材试剂补充或配件更换的设备，在设备底部增加滑轨或转盘以方便其使用和维护。同时为了保障实验环境的无菌需求，DNA元件组装和细胞筛选及培养两大模块采用封闭式设计，配备全覆盖式HEPA空气过滤装置。

为满足不同科研任务需求，最大程度提升装置使用效率，iBioFoundry设计具备多实验任务进程管理功能，能追踪记录全部实验流程的过程处理信息，实现所有样本的追踪溯源。装置的优势和特点包括：①自动化无人值守工作；②多个不同实验任务可同时运行；③运行过程中可随时修改或添加新实验任务；④运行过程中插入优先处理的紧急样本；⑤运行过程中动态补充耗材、试剂；⑥根据实验结果完成智能化逻辑判断；⑦具有完备的设备故障恢复策略；⑧实现远程和批量接收任务指令功能等。

1.2 各模块设备集成及功能

1.2.1 DNA元件组装模块

DNA元件组装模块承担的主要实验任务包括：基因片段的扩增、纯化、酶切、连接、转化及各种生化反应体系的配制等。该模块实验操作通量大，样品板在各设备间移动频繁。工业级机械臂具有效率高、稳定性好的特性，能承担长时间、高频率的高负荷任务，所以此模块中配备了高性能的工业级F7机械臂来完成样本在各设备间的转移。整合的设备包括移液工作站、纳升级声波移液站、自动化封膜机和撕膜机、自动化PCR仪、自动化离心机和自动化耗材存储设备等。

移液工作站作为该模块的核心设备，同时配备了8通道和96通道两个移液机械臂及一个抓扳手机械臂，主要用于样品的高通量快速加样、分装、稀释、混合等操作。移液工作站台面还配置有温控、振荡和磁力架配件，可满足试剂或感受态细胞低温放置、样品快速混匀、产物磁珠纯化等实验步骤中的多种操作需求。纳升级声波移液

站可满足小体积反应体系的需求，设备通过声波实现高精度微量样本（最小液体转移体积为25 nL）转移，具有速度快、无需吸头和无物理接触的特点，可有效避免交叉污染。模块内还包含4台自动化PCR仪，并由中控软件设置为一个PCR设备集合，在同时进行大量PCR实验任务时可自动调整仪器分配，确保多个实验任务的高效、连续运行。紧邻PCR仪的位置，配置有2台封膜机和1台撕膜机，分别用于孔板密封膜和透气膜的封膜及撕膜需求。

1.2.2 细胞筛选及培养模块

细胞筛选及培养模块承担的主要实验任务包括：感受态细胞制备、菌液自动化涂板、平板静置培养、克隆挑取、菌液振荡培养、诱导表达、细胞破碎及蛋白纯化等。此模块也是利用工业级F7机械臂来进行样本在各设备间的传递，整合的设备包括移液工作站、自动化正压过滤装置、大体积快速分液器、自动化振荡培养箱及静置培养箱、自动化低温冰箱、高速冷冻离心机、酶标仪和自动化耗材存储设备等。

此模块内的移液工作站配备了8通道移液和抓扳手两个机械臂，除配有温控和振荡配件外，还增加了克隆挑选和平板旋转配件，满足白光、荧光两种方式菌落挑取及菌液涂布的需求。紧邻移液工作站安装有一套自动化正压过滤装置，可用于DNA和蛋白样品的纯化及液相色谱样品的进样前处理。大体积快速分液器主要用于深孔板中培养基的快速分装。2台自动化振荡培养箱和1台静置培养箱用于满足微生物各种培养需求。高速冷冻离心机于台面以下落地放置，在使用时可通过F7机械臂将需要低温离心的样品通过台面的开孔送入离心机转子内。酶标仪配置有吸收、荧光、自发光三种检测模式，主要用于菌液生长情况和核酸浓度测定及各种酶活动力学分析。

1.2.3 分析检测模块

分析检测模块包括高效液相色谱仪、自动化核酸片段分析仪、流式细胞仪、荧光定量PCR仪四台分析检测设备和一台耗材存储堆栈，可满足核酸质检、克隆鉴定、基因表达分析、蛋白及细胞代谢产物分析等多种检测需求。不同于前述两个模块，分析检测模块采用开放式设计，可随时

接收并快速分析检测样品，也便于耗材、试剂的随时添补及设备的日常维护。出于实验工作量需求和安全性考虑，分析检测模块选择使用协作式机械臂完成各设备及模块间的实验样本传送，主要原因有：①相较于前面两大模块，此处分析检测实验一般时间较长，机械臂移动频率相对不高；②该模块为开放模块，操作人员可能随时进行样本取放，协作式机械臂的碰撞检测功能提高人机交互时的安全性；③在突然断电或发生故障的情况下，孔板不会从机械臂抓手中掉落，实验样本的安全性得以保障。

在 iBioFoundry 日常运行过程中，分析检测设备常会有单机使用的需求，因此模块内还配备有一台耗材存储堆栈以提高分析检测设备的使用灵活性。耗材存储堆栈可随时批量接收需在各设备待检的新样本，也可用于检测完成样本的暂存，保障装置在控制系统调度下长时间、自动化批量处理多种分析检测任务。另外，该耗材存储堆栈处于开放环境中，操作人员可随时经由它向装置内的其他模块补充耗材和试剂，同时装置内部的实验样本也可经由它取出。

1.2.4 样本库模块

样本库模块用于菌种和合成生物学元件的存储和取用。此模块包含一台可存储超十万根 0.5 mL 样品管的 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 自动化生物样本存储设备 (Arctic, SPT labtech) 以及配套的扫码仪和开盖机。Arctic 可实现对大规模样本的自动化管理，包括储存、

样品追踪以及按需自动化选取。设备内部配置了二维条码管理系统，所有样品管带有预制的二维条码，全部存取过程均有记录，可实现对样品管的信息识别和存储位置跟踪。扫码仪可以读取样品管的二维条码并将二维条码与样本信息关联上传中央控制系统，开盖机可以完成样品管的整板开盖和关盖操作。样本库模块与细胞筛选及培养模块共用一个工业级 F7 机械臂完成样本的传输。

iBioFoundry 已建设完成并上线浙江大学杭州国际科创中心大型科研仪器开放共享平台，对各高校、科研院所和企业用户提供实验服务和开展科研合作，装置现场如图 1 所示。

2 科研项目的开展

2.1 科研项目的对接

不同于一般单台仪器设备的使用，科研项目在装置上成功落地运行需要 iBioFoundry 研究团队（以下简称“IB 团队”）和用户之间充分且深入的沟通合作。在双方初期沟通交流时，IB 团队向用户介绍 iBioFoundry 的构造和功能，了解项目的研究背景、研究目标、研究内容、关键技术和已有工作基础等，明确用户利用 iBioFoundry 完成的关键实验内容和实验通量。在此基础上，IB 团队将从技术难度、通量需求、实验安全性、研究周期



图1 iBioFoundry 装置现场图

Fig. 1 Side view of iBioFoundry

和项目落地成熟度等方面对项目进行综合评估，同用户商定工作目标和进度安排。在接下来的交流过程中，IB团队需要明确项目的技术路线、实验材料、实验方法、具体的实验操作参数以及实验中的注意事项等，拟定自动化方案设计意见并与用户沟通确认。

2.2 科研项目的自动化方案制定

自动化方案的制定是项目在iBioFoundry上成功运行的关键。许多实验操作在自动化运行时与线下手工操作有所不同，因此相关的实验步骤、反应体系、实验参数、实验通量等都需进行适应于自动化操作的调整。好的自动化方案需要达到运行流畅、通量高、灵活性好、通用性强、易拓展和成本合理等目标。自动化方案的制定由实验流程拆解、实验方法调整、程序编写和自动化程序测试四个环节组成。

2.2.1 实验流程拆解

自动化方案设计的第一步就是将项目的实验流程基于iBioFoundry运行特性按先后顺序进行拆解而形成多个子任务。实验中反应体系的配置或待测样品的准备主要在移液工作站上完成，因此移液工作站的操作一般会是实验流程拆解的流程节点。例如，基因片段的扩增和鉴定可以拆解成四个子任务，每个子任务中的实验分别是：①移液工作站中配置PCR反应体系、PCR板封膜、PCR反应和PCR板撕膜；②移液工作站上PCR产物的纯化；③移液工作站配制检测样品、核酸片段分析仪检测；④移液工作站根据检测结果选取PCR产物、PCR产物的保存。

2.2.2 实验方法调整

将平时手工操作的实验在iBioFoundry上自动化运行时，往往需要对实验方法进行调整。常见的调整主要有以下几类：①技术调整，如将PCR产物的手工切胶纯化调整为使用移液工作站进行的磁珠纯化或使用自动化正压过滤装置进行的过滤纯化；②设备调整，如核酸检测使用的水平电泳仪更改为核酸片段分析仪；③耗材调整，如离心管、摇瓶等更换为微孔板、深孔板等孔板类耗材；④操作调整，如借助移液工作站的振荡配件

完成试剂混匀操作、借助克隆挑选配件完成克隆挑取、借助平板旋转配件完成菌液涂布等。

2.2.3 程序编写

程序编写分为以移液工作站为主的单机设备程序编写和利用中控软件实现的实验流程自动化程序编写。在移液工作站的程序编写中，需要统计所需生物样本、试剂和耗材的种类及数量，明确其进出工作站的转接位置和工作站内台面的摆放位置，通过调用相应机械臂完成液体取样、加样、孵育、振荡、挑菌、涂布等各种操作。其余单机设备的程序编写主要在相应设备上设置或编写完成并保存为可执行文件，以供中控软件在整个项目自动化运行时随时调用。在所有单机设备程序完成后，整体实验流程的自动化程序由中控软件(Momentum, Thermo Fisher Scientific)编写，通过机械臂的程序设定串联各子任务实验，将实验样本按设计流程在iBioFoundry中逐步传递至各设备中并完成相应操作。除机械动作外，实验流程自动化程序编写中还应注意实验数据的汇总和分析，结合数据生成与存储、数据文件调用、逻辑条件判断和多变量参数控制等软件功能实现实验流程的智能化选择，并保存所有样本的全过程处理信息。

2.2.4 自动化程序测试

在项目自动化运行前，需要对编写完成的自动化程序进行测试，测试分为三步：模拟测试、水样测试和生物样本测试。模拟测试是利用中控软件的模拟测试功能，在计算机上模拟实验的运行情况，排查真实运行过程中可能出现的诸如设备使用冲突、位置占用、耗材数量不足等问题。水样测试是以水溶液或其他试剂代替生物样品进行的真实运行测试，实验流程中涉及的所有设备程序和机械臂动作指令都会按设计执行。水样测试主要检查各种反应体系的配置是否准确，各种机械动作是否运行到位，设备联动和数据通讯是否能顺利完成。生物样本测试则是使用真实生物样本，以实验结果为导向，验证整个自动化程序运行过程中每一个实验步骤是否都能顺利完成并达到预期结果。

2.3 科研项目的自动化运行

项目在iBioFoundry上正式运行前，应检查系

统确保所有的电源、通讯、空气、液体管路都已连接，确保系统运行涉及的设备及辅助设施均已开启并进入工作状态。实验运行中机械臂途经的各个位置没有无关耗材占据，所需生物样本、试剂、耗材等补充齐全。安全及环境控制设备妥善启动，系统软件正常且无特殊报警标识。实验运行中注意观察各种机械动作执行到位情况，如有状况及时处理，留意出现的各种实验现象并记录。运行结束后，妥善保存实验样本并及时处理操作过程中产生的废弃耗材和废液，将系统整体清理干净以备后续实验任务的执行。

IB团队将实验运行得到的样本和运行总结报告一并提供给用户。双方对实验运行情况、实验数据和所得样本一起分析、探讨。IB团队根据运行中各实验进程完成情况、各设备占用时间分布等提出自动化优化建议，用户就实验结果进一步反馈需求，双方共同研究并制定后续项目执行方案。

3 iBioFoundry 实验运行案例

iBioFoundry 目前已成功实现大肠杆菌、酵母细胞、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌等多种工业微生物“人工细胞”的全自动构建。本文以大肠杆菌工程菌的批量构建为例，介绍项目自动化方案的制定过程和实验在 iBioFoundry 上的具体运行

情况，并通过酶的定向进化及筛选案例就实验流程的智能化选择和实验通量进行分析。

3.1 大肠杆菌工程菌的批量构建

3.1.1 自动化方案的制定

按流程顺序可将整个实验拆解成9个子任务，依次是：PCR反应、PCR产物纯化、核酸片段分析、DNA组装、质粒转化、菌液涂布培养、克隆挑选与培养、菌落鉴定以及菌株保存（图2）。为了适应自动化操作，部分实验方法做如下调整：①以磁珠纯化法代替切胶回收，利用移液工作站完成PCR产物的纯化；②使用自动化核酸片段分析仪检验PCR产物的质量；③利用荧光定量PCR仪对菌株构建的正确性进行验证。

编写实验流程中各单机设备的运行程序，9个子任务中的关键设备和所编写的程序名称见表1。在此基础上，确定各设备的实验操作参数，通过中控软件利用程序并行、变量控制、逻辑判断、数据提取、数据写入等功能编写完成整个实验流程的自动化程序（图3）。根据模拟测试、水样测试和生物样本测试的反馈结果对整个实验流程的自动化程序做出进一步的调整与优化，并最终形成实验的自动化方案。

3.1.2 实验自动化运行

实验上机运行前首先对装置进行全面检查，确保所有设备已上线并处于正常工作状态。根据

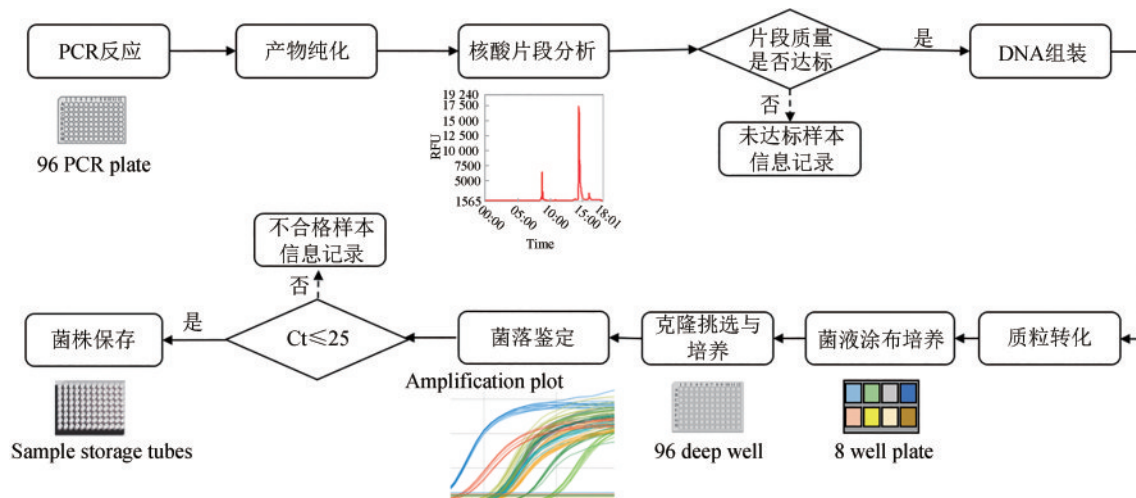


图2 工程菌批量构建实验流程

Fig.2 Procedure of high-throughput engineered *E. coli* construction

表1 子任务实验步骤和单机程序

Table 1 Relevant operation and involved scripts of the experiment

编号	子任务名称	实验步骤	需编程的设备	程序名称
1	PCR反应	PCR反应体系配置 封膜 离心 PCR扩增	移液工作站 自动化PCR仪	Pre_Target_PCR Target_PCR
2	产物纯化	撕膜 磁珠纯化	移液工作站	PCR_Product_Purification
3	核酸片段分析	核酸片段检测体系配置 核酸片段分析	移液工作站 自动化核酸片段分析仪	Pre_Fragment_Analysis Fragment_Analysis_50 to 6000 bp
4	DNA组装	样品筛选及试剂分装 DNA组装反应体系配制 封膜 离心 DNA组装反应	移液工作站 纳升级移液工作站 自动化PCR仪	Sample_Selection Pre_DNA_Assembly DNA_Assembly
5	质粒转化	撕膜 质粒转化体系配置 封膜 热激 孵育	移液工作站 自动化PCR仪	Pre_Plasmid_Transforming Plasmid_Transforming
6	菌液涂布培养	8孔矩形培养板涂布 平板静置培养	移液工作站	Dilution_Plating
7	克隆挑选与培养	培养基分装 克隆挑选 封膜 菌液振荡培养	移液工作站	Clone_Picking
8	菌落鉴定	荧光定量PCR反应体系配置 封膜 离心 荧光定量PCR检测	移液工作站 荧光定量PCR仪	Pre_Clone_Verification Clone_Verification
9	菌株保存	开盖 菌株挑选与保存 关盖 样本存储	移液工作站	Positive_Sample_Selection

注：仅列举需要进行程序编写的单机设备及对应程序，省略简单参数调用即可完成操作的相关设备，如离心机、封膜机、撕膜机、培养箱等。

实验自动化方案中程序对于实验材料的位置设定，将所需试剂包括引物、DNA模板、大肠杆菌感受态细胞、PCR反应试剂等和各类耗材分别添加至自动化低温冰箱和各个自动化耗材存储设备并确认放置位置正确。iBioFoundry中共有24列载架、10列载架和6列载架三种不同容量规格的耗材存储设备，分别位于DNA元件组装模块、细胞筛选及培养模块和分析检测模块。实验所需试剂和耗材的种类、数量以及在装置中实验开始及结束时的位置见表2。

实验流程的第一个子任务是PCR反应，使用96对引物分别扩增得到96个目的基因片段。工业

级F7机械臂将引物、DNA模板、PCR反应试剂等从自动化低温冰箱内依次取出，送至撕膜机撕膜后移至移液工作站备用。机械臂再从自动化耗材存储设备内依次取出1盒50 μL黑色吸头、2盒50 μL透明吸头和1块96孔微孔板转移至移液工作站。试剂和耗材齐备后，移液工作站执行PCR反应体系配制程序，利用8通道和96通道移液机械臂分别吸取水、DNA模板、PCR反应试剂和引物至96孔微孔板内，完成50 μL PCR反应液的配制（PCR反应试剂25 μL，引物各2 μL，DNA模板2 μL，水19 μL）。盛放PCR反应液的96孔微孔板随后由F7机械臂转移至自动化封膜机进行密封，经自动化

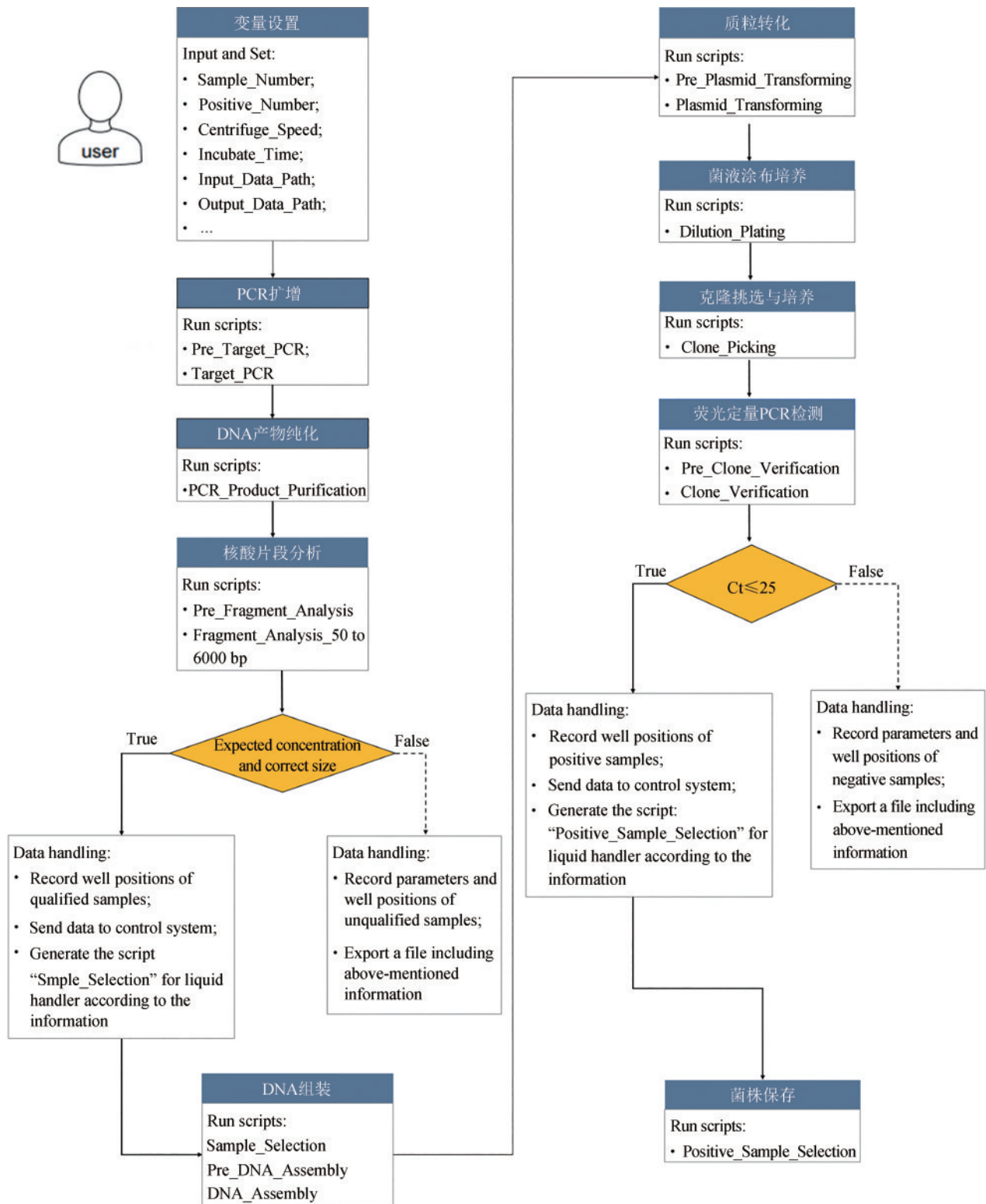


图3 实验流程自动化程序编写示意图

Fig.3 A simplified scheme of automated program

表2 试剂与耗材信息

Table 2 Reagents and consumables used in experiment

类型	名称	数量	起始位置	结束位置
试剂	引物	2块	自动化低温冰箱 1-[1-2]	6列耗材存储设备 2-[1-2]
	DNA模板	1块	自动化低温冰箱 1-[3]	6列耗材存储设备 2-[3]
	大肠杆菌感受态细胞	1块	自动化低温冰箱 1-[4]	耗材回收桶
	PCR反应试剂	1块	自动化低温冰箱 1-[5]	自动化低温冰箱 1-[5]
	DNA组装试剂	1块	自动化低温冰箱 1-[6]	自动化低温冰箱 1-[6]
	qPCR检测试剂	1块	自动化低温冰箱 1-[7]	自动化低温冰箱 1-[7]
耗材	50 μ L 黑色吸头	2盒	24列耗材存储设备 1-[1-2]	耗材回收桶
	200 μ L 黑色吸头	7盒	24列耗材存储设备 2-[1-7]	耗材回收桶
	50 μ L 透明吸头	4盒	24列耗材存储设备 1-[3-6]	耗材回收桶
	200 μ L 透明吸头	3盒	24列耗材存储设备 3-[1-3]	耗材回收桶
	8孔矩形培养板	12块	10列耗材存储设备 1-[1-12]	自动化低温冰箱 2-[1-12]
	96孔微孔板	4块	24列耗材存储设备 4-[1-4]	自动化低温冰箱 1-[8-11]
	96孔深孔板	8块	10列耗材存储设备 2-[1-8]	10列耗材存储设备 2-[1-8]
	96位样本架	3块	6列耗材存储设备 1-[1-3]	Arctic 冰箱
384孔微孔板	4块	24列耗材存储设备 4-[5-8]	6列耗材存储设备 2-[4-7]	

注：试剂存放于96孔微孔板。位置信息 1-[1-2] 表示第1列载架的第1和第2号板位。

离心机 2000 r/min 转速下离心 1 min 后送至自动化 PCR 仪中进行 PCR 扩增。PCR 扩增的同时，F7 机械臂将移液工作站内的各类试剂经封膜机密封后放回自动化低温冰箱。PCR 反应结束后，利用移液工作站的磁力架配件完成 PCR 产物的磁珠纯化。纯化产物在核酸片段分析仪进行片段大小和片段浓度的检测，中控软件根据检测结果挑选质量达标（片段浓度在 10 ng/ μ L 以上，片段大小正确且无杂带）的样本进行后续 DNA 组装反应。DNA 组装和质粒转化完成后，吸取 50 μ L 样本涂布至 8 孔矩形培养板内，利用移液工作站内部的振荡配件将 8 孔矩形培养板于 500 r/min 振荡 1 min 将孔内菌液分布均匀。静置培养 12 h 后，利用移液工作站的克隆挑选配件每孔挑取 3 个直径 1.5 mm 以上、间距大于 3 mm 的菌落进行液体培养。通过荧光定量 PCR 仪检测菌液中是否含有目标基因片段以验证工程菌是否构建成功。中控软件根据荧光定量 PCR 检测结果，指导移液工作站选取 Ct 值（cycle

threshold，阈值循环数） ≤ 25 的阳性样本并将其转接至菌种保藏管内，最终构建成功的工程菌放置于 Arctic 冰箱保存。

3.2 酶的定向进化及筛选

酶的定向进化通过改造酶的结构并利用高通量筛选手段，可以快速得到具有特定催化活性、稳定性或选择性的酶，以满足各种研究或应用需求。针对实验中大量突变子的操作需求，通常需要将高通量的培养、检测和分析手段相结合以提高研究效率。本文以酶标检测作为初筛方法结合高效液相色谱分析作为复筛方法，对在 iBioFoundry 上完成酶定向进化的实验案例进行说明（图 4）。首先利用易错 PCR 或对关键位点进行随机突变等方法构建目标基因的突变文库，转入大肠杆菌后利用移液工作站的克隆挑选配件挑取菌落进行液体培养，根据 OD 检测数据掌握菌体生长情况并择机诱导，诱导表达结束后测定菌液 OD

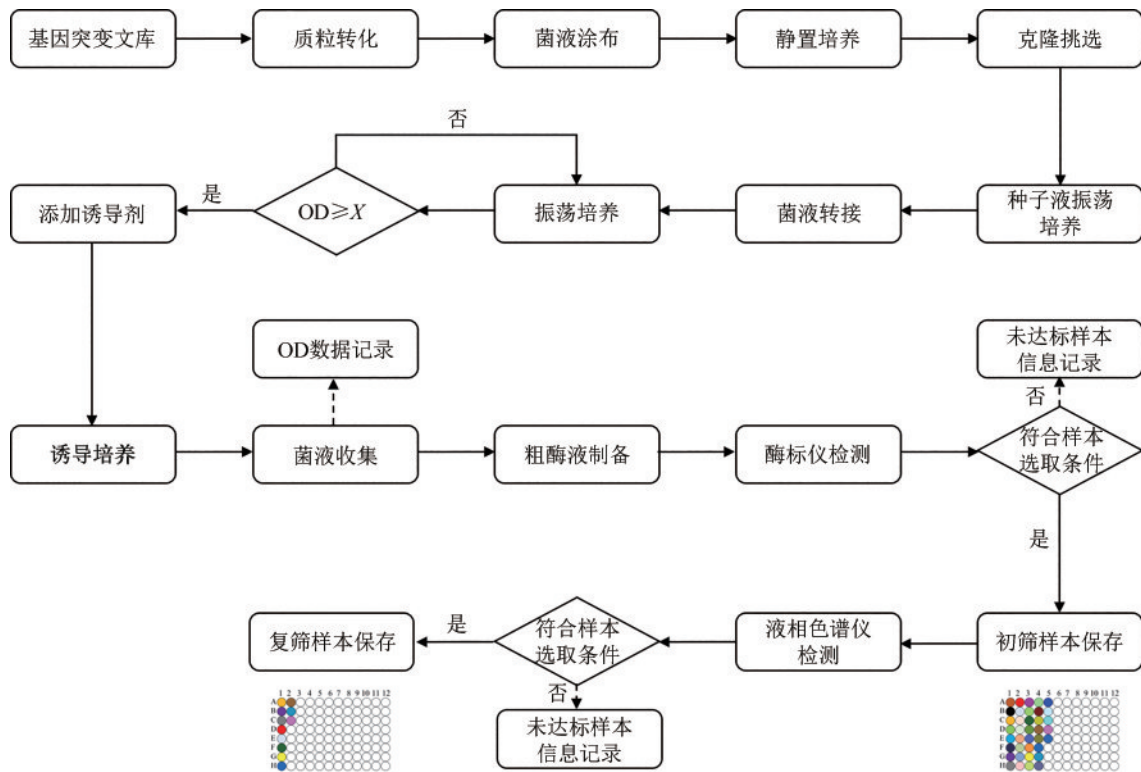


图4 酶定向进化及筛选实验流程

Fig.4 Procedure of enzyme directed evolution and screening

值。对于分泌表达的酶蛋白，孔板经离心取上清即得到粗酶液。如果是胞内蛋白，离心收集菌体后加入裂解液经振荡孵育破碎细胞，裂解液离心后取上清获得粗酶液。利用酶标仪检测酶活，根据检测结果筛选样本进行液相色谱复筛，最后根据检测数据筛选优势菌株保存，用于后续测序分析或进入下一轮的定向进化实验。

利用中控软件中的变量控制、逻辑判断、循环、数据提取、导入与导出等功能，可实现对实验流程的智能化控制。在本案例的实验流程中，有三个节点可以通过对实时检测数据的分析而实现对下游实验流程的智能选择，分别是：①根据菌液OD数据选择诱导时机；②根据酶标检测数据筛选样本进入复筛；③根据液相色谱检测数据筛选菌液样本保留备用。对于酶标检测和液相色谱分析得到的数据，可以直接根据其大小对样本信息进行排序。亦可通过计算处理得到检测数值/菌液OD值的比值，即选取均一化的检测数据来进行分析，以降低由菌体生长差异而带来的分析误差。在筛选过程中，可以通过中控软件的程序编写实

现多种样本选取策略以满足不同实验需求，如：

①选取检测数据大于对照组的样本；②选取检测数据在设定数值以上的样品；③选取一定比例检测数据最高的样本等。移液工作站根据中控软件输出的数据文件，选取指定孔位的样本转移至新的孔板并重新排列，完成样本的挑选和保存。通常实验的通量主要取决于装置中各类耗材存放及细胞培养的空间大小。iBioFoundry中有三台自动化耗材存储设备用于各类耗材的存放，一台大容量静置培养箱和两台自动化振荡培养箱分别用于细胞的静置和振荡培养。本案例中实验的通量主要依赖于振荡培养箱的储存容量，每台振荡培养箱可以存放14块96孔深孔板或32块96孔微孔板。根据实验需要，如将突变子挑取在96孔深孔板中培养，则在两天内可以完成28块96孔板的筛选任务，即可同时操作2688个实验样本。如目标酶蛋白是胞外产物，对细胞量的需求不高，此情况下若采用96孔微孔板培养细胞，则iBioFoundry可以同时处理64块96孔板，即6144个实验样本。

4 iBioFoundry 建设中几点经验

4.1 耗材存储空间的分配

自动化耗材存储设备作为 iBioFoundry 中一个不可或缺的组成部分,其作用是存放实验中所需的吸头、深孔板、微孔板等各类耗材。iBioFoundry 上运行不同的科研项目,因实验内容和实验通量的不同,所需耗材的种类和数量也会不尽相同。实验开始前的准备过程中就需要统筹考虑所需各种耗材在开始时和实验结束时的存储位置。自动化耗材存储设备的摆放位置和其内部空间的布局关系到整个自动化科学装置的实验通量和工作效率。

iBioFoundry 装置内共有三台自动化耗材存储设备,分别位于 DNA 元件组装模块、细胞筛选及培养模块、分析检测模块。不同容量的自动化耗材存储设备包含的载架数量不同,同时载架上的每个耗材摆放位置的高度可以人为设置,其高度主要分 4 个级别:低位(酶标板、微孔板等)、中位(深孔培养板等)、高位(吸头盒等)和超高位(大容量吸头盒等)。DNA 元件组装模块位于整个装置的中心位置,且耗材需求量大,因此将一台 24 列大容量耗材存储设备配置于此模块的移液工作站边上。考虑到 DNA 元件组装相关实验会较多用到微孔板和一次性小体积的吸头,因此该设备中低位载架和高位载架占比较大(表 3)。细胞筛选及培养模块则配备了一个 10 列耗材存储设备,其中 8 列载架选择中位载架和低位载架,用于存放

细胞培养过程中使用的深孔板、微孔板类耗材,另 2 列配置有超高位载架,存放 1 mL 规格的吸头盒用于菌液或其他溶液的吸取。位于分析检测模块配置有一台 6 列耗材存储设备,其中 4 列选择低位载架用于自动化核酸片段分析仪、流式细胞仪和荧光定量 PCR 仪的耗材存储,另 2 列选择高位载架用于高效液相色谱样品板的存储。

4.2 多实验任务并行

多实验任务并行能大幅提高 iBioFoundry 的运行效率。本系统的中央控制软件具备任务的动态进程管理功能,可统筹计算并实现多个任务中各进程的最佳时间和设备资源调配,达到多任务同时运行的目标。在此基础上,iBioFoundry 还允许在实验进行中的任意时间点添加新任务,并按照实验需求优化时间和资源分配,同时保障多个实验的运行效率。在多任务并行时,存在公共耗材资源如何协调分配的问题,也可能遇到多个并行程序同时调用某个设备的情况。因此在前期自动化程序编写及上机运行时,需多加注意并解决因多任务对装置中各种资源的需求而引发的矛盾。

自动化程序编写时,为防止实验流程中某些关键环节所需设备在使用时不被其他任务的程序调用,可在程序中设定设备锁定参数,只有当锁定设备的程序结束后,设备锁定参数才被释放给其他程序并用于设备资源的调用。当任务中存在

表 3 自动化耗材存储设备及其内部位置分配情况

Table 3 Automated consumable-storing devices and inner resource allocation

存储设备	设备内载架类型(高度)	列数	板位数/列	功能
24 列耗材存储设备	高位载架(69 mm)	10 列	7 plates	可存放 70 盒 SBS 规格吸头盒
	中位载架(50 mm)	8 列	10 plates	可存放 80 块 SBS 规格深孔板
	低位载架(23 mm)	6 列	21 plates	可存放 126 块 SBS 规格微孔板
10 列耗材存储设备	超高位载架(128 mm)	2 列	4 plates	可存放 8 盒 SBS 规格吸头盒
	中位载架(50 mm)	5 列	10 plates	可存放 50 块 SBS 规格深孔板
	低位载架(23 mm)	3 列	21 plates	可存放 63 块 SBS 规格微孔板
6 列耗材存储设备	高位载架(69 mm)	2 列	8 plates	可存放 16 块 SBS 规格深孔板
	低位载架(31 mm)	4 列	15 plates	可存放 60 块 SBS 规格微孔板

实验样本在两个实验步骤之间不能等待而必须立即依次执行操作的情况，可将此时的样本设定成紧急样本，通过程序优先级的设置，实现紧急样本对其他并行任务实验流程所需设备的优先占用，达到插队操作的目标。

对于多实验任务并行，需要统计各个任务所需全部耗材的种类、数目并对始末存放位置做出规划。在自动化程序编写时，可将耗材属性做公用和专属的设定：公用耗材一般为新的吸头、微孔板、深孔板等供多个任务共同使用；专属耗材则为特定实验任务所需的耗材，其他实验任务的程序不能调用。在程序中通过添加耗材计数参数，使中央控制软件能实时掌控耗材存储设备中各类耗材的真实使用情况（如某一吸头盒中剩余的可用吸头数量），以致程序在耗材调用时做出正确选择。在耗材准备过程中，专属耗材与公用耗材、同属性中不同类型的耗材都需对其在自动化耗材存储设备中的摆放位置做出相应区分，以此避免多任务运行中耗材选择错误，也有助于任务开始前耗材的添加和任务结束后耗材的清理。在多任务运行时，某个任务可能提前结束或需要临时插入，此时有对相应耗材进行取出或添补需求。此类情况可通过修改自动化程序，将其耗材供应或结束位置设定为位于分析检测模块（开放区域）的自动化耗材存储堆栈，避免耗材存取过程对在线运行项目的影响。

不同实验任务可能分属 IB 团队中的多人各自负责，各个成员应在多实验任务运行前对运行时间、运行时长、实验内容、资源需求等进行充分的沟通交流，合理分配设备与耗材等资源，制定出稳定、高效的多任务运行计划。全部任务结束后，注意分工合作对各自实验任务的实验样品和耗材等进行整理，并对整个装置进行全面检查。

4.3 实验流程标准化建设

自动化实验方案的制定过程中需要将具体实验流程拆解成多个子任务并编写相应的自动化程序。许多合成生物学实验中的子任务具有通用性

高的特点，比如 PCR 反应体系的配置、基因的质检和纯化、菌落的挑取和涂布、菌种的培养等。不同用户的实验流程中可能都会包含诸如此类的子任务，虽然它们的实验对象、实验通量、具体实验参数会有所不同，但用到的实验耗材、试剂、设备及相应机械臂操作动作都大致相同。iBioFoundry 中实验流程的标准化，即将实验流程中各个子任务的自动化程序编写和测试规范化并最终制定整个实验流程的标准操作文档。其中子任务自动化程序的标准化编写和整体实验流程标准化文档的制定是两个关键环节。

子任务自动化程序文档包含实验内容、耗材种类及数量、程序名称、程序存储路径和具体程序代码等内容。程序代码需配上相应注释以备后续修改且方便他人阅读。移液工作站的自动化程序文档中需规范台面耗材摆放位置，对不同类型板材或吸头在移液工作台面摆放做出区域划分，明确耗材移动路径，每一步自动化操作后的耗材位置都以图片的形式留档，方便程序测试时核对。自动化程序的编写应注重其灵活性和通用性，涉及的样品数量、移液体积和反应条件等各个实验参数可采用变量的形式指定，以灵活应对不同的实验需求。在自动化程序文档中最后应写明程序调试和测试方法及验收标准。整体实验流程标准化文档包含实验目的、适用范围、实验设备、试剂耗材、实验方法、子任务程序、整体实验流程自动化程序、数据分析方法、总结报告、样品交付和注意事项等内容。

对于在 iBioFoundry 上落地的不同科研项目的各种实验流程，如果每个 IB 团队成员均按个人经验和偏好去制定相应自动化实验方案，不仅费时费力而且实验需要在装置上同时运行时难免会存在各种冲突。实验流程的标准化通过各种程序的规范化编写提高它们的通用性，避免 IB 团队成员每次从头编写，通过简单的调用和调试即可完成某一任务目标。实验流程的标准化也便于团队装置使用经验的交流和积累，对提高装置的运行质量、运营效率和整体综合服务能力都至关重要。

5 展 望

以合成生物学为代表的生物科技的颠覆性突破, 将带来生命健康、医药、农业、化工等领域的巨大变革, 产生难以估量的社会效益和经济效益^[24-25]。其发展趋势之一是利用合成生物学标准化和模块化优势并结合生物过程自动化, 全自动高效构建功能生命体, 实现人工合成生命的智能调控和复杂功能。合成生物学自动化装置的应用为提升高通量实验的效率和大量高质量数据的获得提供了新的解决方案。所产生的大量多维度的数据与人工智能和机器学习相结合, 提升理性设计能力, 助力“学习”和“设计”的自动化, 从而最终实现“设计-构建-测试-学习”全闭环的自动化运行。“BT+IT”的融合不仅会提升人类认识生物、调控生物、改造生物的能力, 还将改变生命科学的发展方式从“实验驱动”向着“数据驱动”转变。自动化合成生物技术的发展有望开启合成生物学“BT+IT”融合新领域, 对于抢占科技竞争和产业竞争的制高点具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] SISMOUR A M, BENNER S A. Synthetic biology[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2005, 5(11): 1409-1414.
- [2] 张先恩. 中国合成生物学发展回顾与展望[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(12): 1543-1572.
ZHANG X E. Synthetic biology in China: Review and prospects[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2019, 49(12): 1543-1572.
- [3] 赵国屏. 合成生物学: 开启生命科学“会聚”研究新时代[J]. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1135-1149
ZHAO G P. Synthetic biology: unsealing the convergence era of life science research[J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2018, 33(11): 1135-1149.
- [4] CAMERON D E, BASHOR C J, COLLINS J J. A brief history of synthetic biology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(5): 381-390.
- [5] KHALIL A S, COLLINS J J. Synthetic biology: applications come of age[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(5): 367-379.
- [6] MARTIN V J J, PITERA D J, WITHERS S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 796-802.
- [7] WIN M N, SMOLKE C D. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices[J]. *Science*, 2008, 322(5900): 456-460.
- [8] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [9] CHAO R, MISHRA S, SI T, et al. Engineering biological systems using automated biofoundries[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 98-108.
- [10] 唐婷, 付立豪, 郭二鹏, 等. 自动化合成生物技术与工程化设施平台[J]. *科学通报*, 2021, 66(3): 300-309.
TANG T, FU L H, GUO E P, et al. Automation in synthetic biology using biological foundries[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(3): 300-309.
- [11] LE FEUVRE R A, SCRUTTON N S. A living foundry for Synthetic Biological Materials: a synthetic biology roadmap to new advanced materials[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(2): 105-112.
- [12] KANG D H, KO S C, HEO Y B, et al. RoboMoClo: a robotics-assisted modular cloning framework for multiple gene assembly in biofoundry[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(3): 1336-1348.
- [13] SI T, CHAO R, MIN Y H, et al. Automated multiplex genome-scale engineering in yeast[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15187.
- [14] CHAO R, LIANG J, TASAN I, et al. Fully automated one-step synthesis of single-transcript TALEN pairs using a biological foundry[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(4): 678-685.
- [15] STORCH M, HAINES M C, BALDWIN G S. DNA-BOT: a low-cost, automated DNA assembly platform for synthetic biology[J]. *Synthetic Biology*, 2020, 5(1): ysaa010.
- [16] 崔金明, 张炳照, 马迎飞, 等. 合成生物学研究的工程化平台[J]. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1249-1257.
CUI J M, ZHANG B Z, MA Y F, et al. Engineering platforms for synthetic biology research[J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2018, 33(11): 1249-1257.
- [17] HILLSON N, CADDICK M, CAI Y Z, et al. Building a global alliance of biofoundries[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2040.
- [18] 晁然, 原永波, 赵惠民. 构建合成生物学制造厂[J]. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45(10): 976-984.
CHAO R, YUAN Y B, ZHAO H M. Building biological foundries for next generation synthetic biology[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2015, 45(10): 976-984.
- [19] 张亨, 冷梦甜, 金帆, 等. 合成生物研究重大科技基础设施概述[J]. *合成生物学*, 2022(1): 184-194.
ZHANG T, LENG M T, JIN F, et al. Overview on platform for synthetic biology research at Shenzhen[J]. *Synthetic Biology*

- Journal, 2022(1): 184-194.
- [20] ZHANG J Z, CHEN Y C, FU L H, et al. Accelerating strain engineering in biofuel research *via* build and test automation of synthetic biology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 67: 88-98.
- [21] WU F, JIN S T, JIANG Y H, et al. Pre-training of equivariant graph matching networks with conformation flexibility for drug binding[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(33): 2203796.
- [22] WANG J, ZHANG X Q, CHENG L X, et al. An overview and metanalysis of machine and deep learning-based CRISPR gRNA design tools[J]. *RNA Biology*, 2020, 17(1): 13-22.
- [23] CARBONELL P, RADIVOJEVIC T, GARCÍA MARTÍN H. Opportunities at the intersection of synthetic biology, machine learning, and automation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8 (7): 1474-1477.
- [24] ZHANG J, HANSEN L G, GUDICH O, et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 341-347.
- [25] CAI T, SUN H B, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic

starch synthesis from carbon dioxide[J]. *Science*, 2021, 373 (6562): 1523-1527.



通讯作者: 黄磊(1977—),男,副教授,博士生导师。研究方向为代谢工程、合成生物学。

E-mail: lhuangblue@zju.edu.cn



第一作者: 卢挥(1994—),男,硕士,自动化装置工程师。研究方向为合成生物学。

E-mail: luhui11@zju.edu.cn