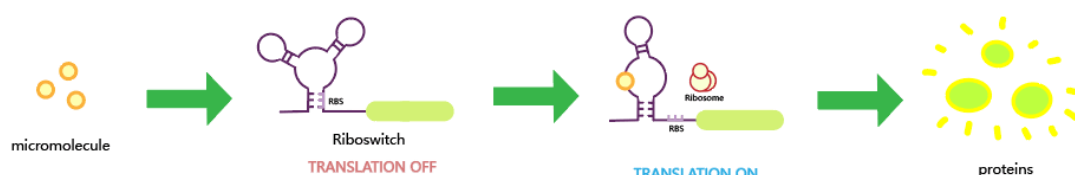


# RiboLego

OUC-China

## 项目摘要:

核糖开关是一种转录后调控元件，它们能够通过感应多种小分子配体或环境条件来调控下游基因表达，因此在合成生物学中具有重要作用。然而，由于核糖开关的二级结构易受下游目的基因影响，因此至今核糖开关仍然没有办法被视为模块化的元件。为了解决这一问题，今年的 OUC-China 团队提出了一种模块化核糖开关的设计原则。



## 项目设计:

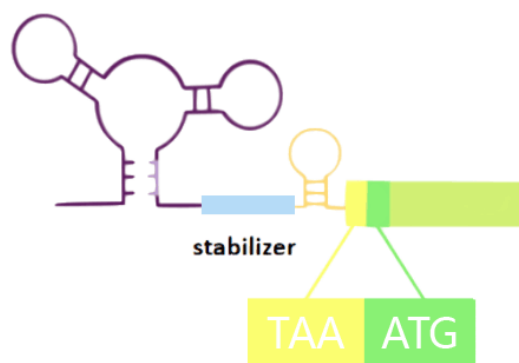
由于核糖开关的二级结构易受下游基因影响，因此直接在核糖开关下游加入目的基因可能会导致核糖开关二级结构发生改变，进而无法响应配体以对下游目的基因的表达进行调控。目前解决这一问题所采用的常规方法是在核糖开关下游、目的基因上游加入一段随机序列以稳定核糖开关的二级结构。



由于随机序列的存在是为了防止目的基因引起核糖开关二级结构发生改变，因此每改变一次目的基因就需要对随机序列进行一次重新设计。而随机序列的设计通常采用随机突变，这一过程是十分繁琐且复杂的。

为了解决这一问题，OUC-China 团队提出了一种构建随机序列的新方法：寻找已经能够被证明、能稳定核糖开关二级结构的序列，并将其称为 Stabilizer。该序列一般出自天然基因组中（即通过 blast 的方法直接获取位于基因组中核糖开关下游的天然目的基因）或论文中已经构建成功的基因回路（即已证明该基因不会影响核糖开关二级结构），通过截取其一部分来替代传统的随机序列。

这种方法节省了时间与精力，但是会造成新问题的出现：由于该序列是位于 N 端的冗余序列，因此可能会造成目的基因结构和功能的改变。对此，OUC-China 团队引入了一个全新的结构 Tuner。Tuner 是一个包含起始密码子和终止密码子的序列，其有两个作用，一是隔离 Stabilizer 与目的基因，避免影响目的基因结构和功能；一是调节下游目的基因的表达量，满足各种情况下对基因比例的特定要求。

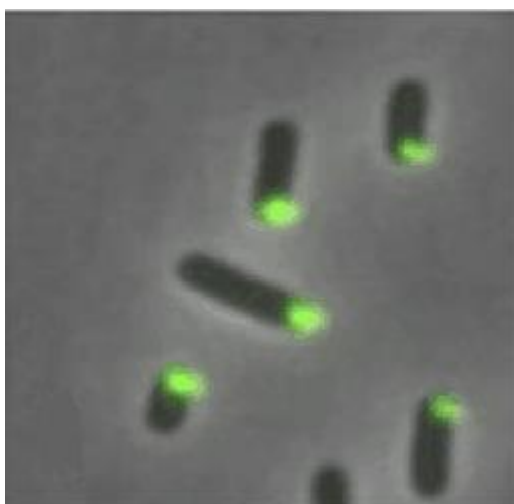
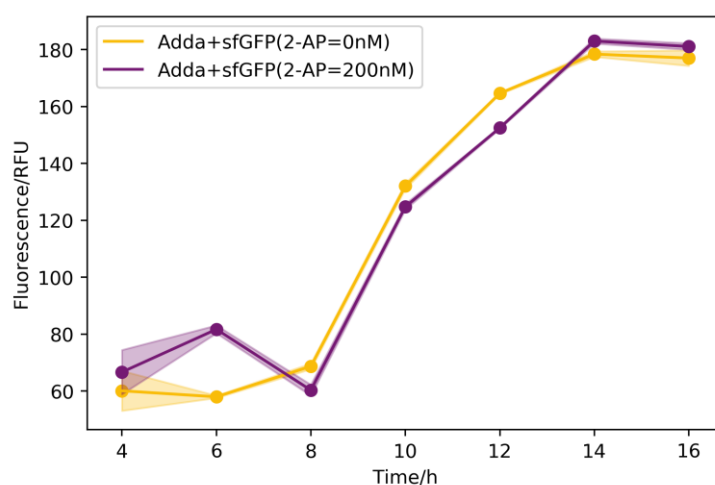


总而言之，我们提出了一套模块化核糖开关的原则，即模块化后的核糖开关应包括原有核糖开关序列、Stabilizer、Tuner 三部分。

### 结果与总结：

为验证模块化核糖开关设计原则的普遍性，本实验中所使用的核糖开关为两种，一种为 Adda 核糖开关，其为激活型核糖开关，即响应配体而开启下游基因表达；另一种为 Btub 核糖开关，为抑制型核糖开关，响应配体浓度而关闭下游基因表达。

#### 1. 现有核糖开关设计策略存在的问题



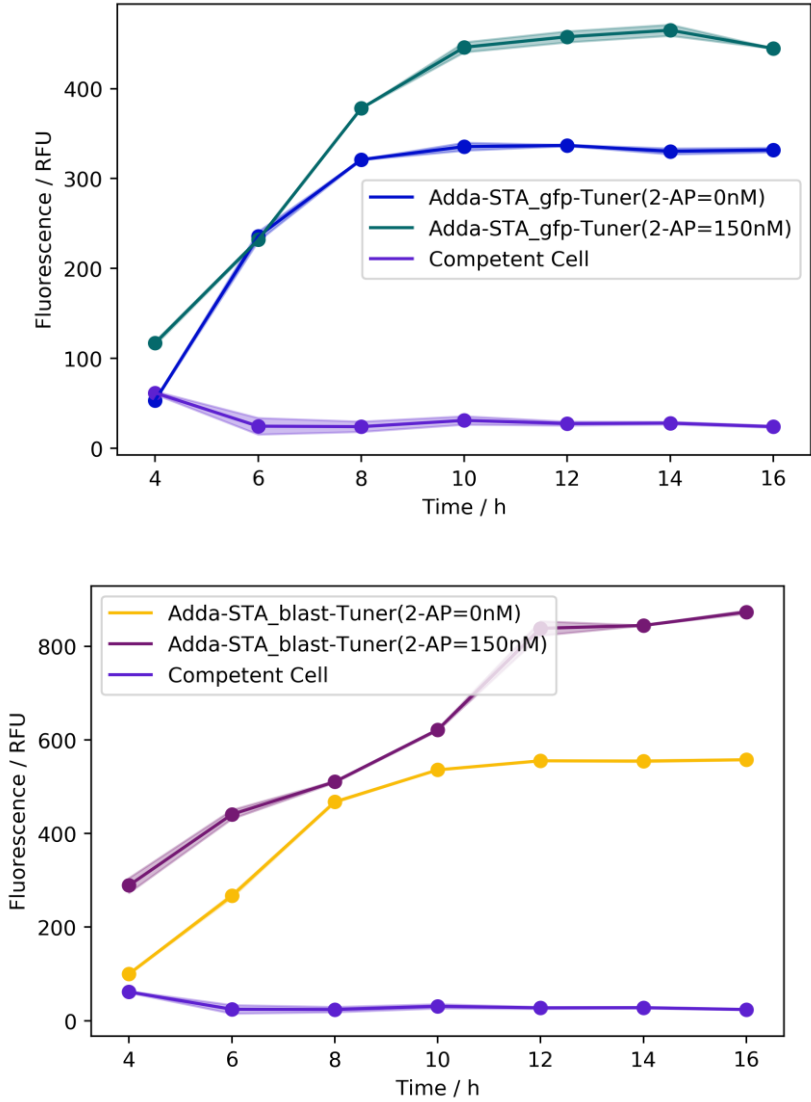
图一：Adda 核糖开关直接加目的基因，无论是否加入配体，荧光表达量均很低。

棕线是加入配体的实验组荧光表达量曲线，黄线是不加入配体的对照组荧光表达量曲线。两条荧光曲线无明显差异。

图二：Adda 核糖开关+ Stabilizer +目的基因，荧光显微镜下形成包涵体现象。

荧光显微镜下，绿色荧光蛋白集中于大肠杆菌的一边，出现包涵体现象：说明冗余序列的加入有可能影响目的基因结构和功能。

2. 模块化 Adda 核糖开关的构建



图一：在已有论文中截取的 150bp 的 Stabilizer。

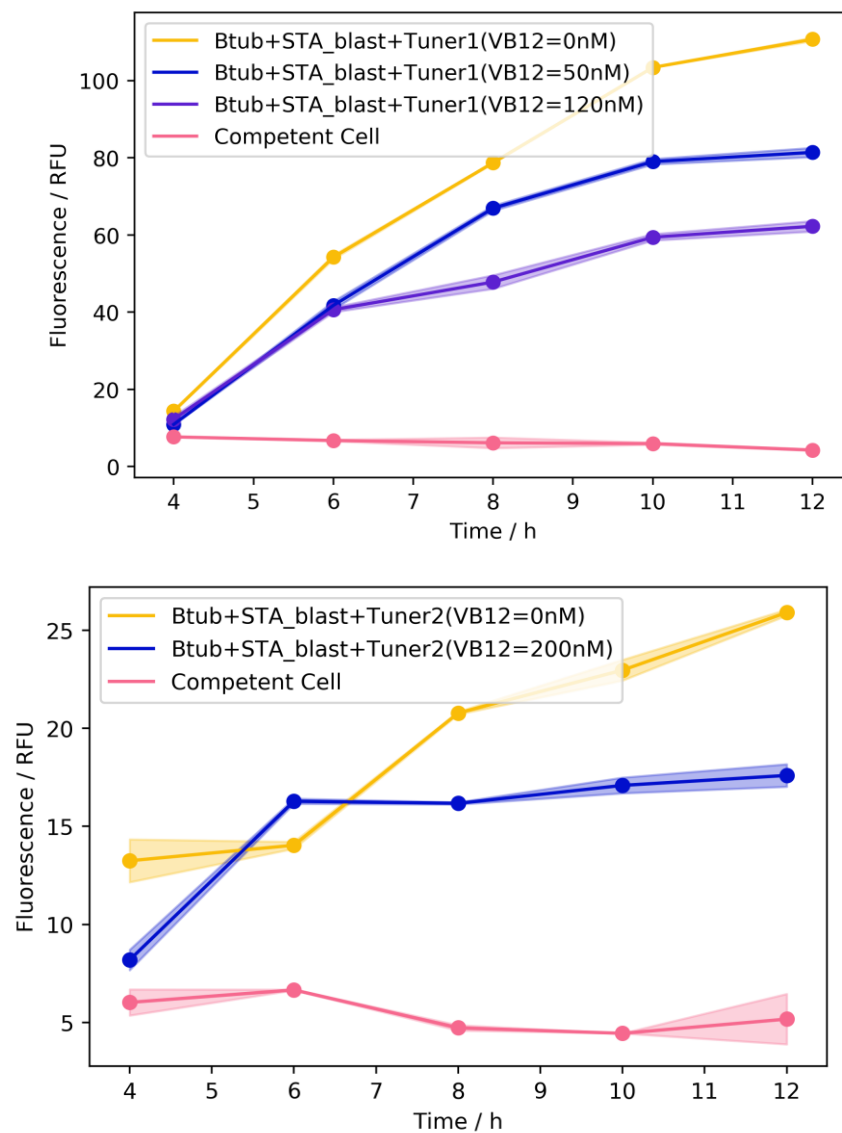
绿线是加入配体的实验组荧光表达量曲线，蓝线是不加入配体的对照组荧光表达量曲线。实验组荧光量对比对照组有较大提升，表明加入配体后核糖开关被打开。

图二：在天然基因组中截取的 150bp 的 Stabilizer。

棕线是加入配体的实验组荧光表达量曲线，黄线是不加入配体的对照组荧光表达量曲线。实验组荧光量对比对照组有较大提升，表明加入配体后核糖开关被打开。

紫线是感受态的背景荧光。

### 3. 模块化 Btub 核糖开关的构建



图一：在天然基因组中截取的 150bp 的 Stabilizer 与 Tuner1 组合构建的核糖开关。黄线是不加入配体的对照组荧光表达量曲线，蓝线和紫线分别是加入配体浓度为 50nM 和 100nM 的荧光曲线。三组荧光量对比说明构建的模块化核糖开关能够成功浓度梯度。

图二：在天然基因组中截取的 150bp 的 Stabilizer 与 Tuner2 组合构建的核糖开关。蓝线是加入配体的实验组荧光表达量曲线，黄线是不加入配体的对照组荧光表达量曲线。实验组荧光量对比对照组有较大提升，表明加入配体后核糖开关被打开。

两张图的荧光绝对值对比说明不同 Tuner 能够调节下游基因表达量。