

项目可行性分析

1. 可行性

本项目采用了融合蛋白基因工程技术对 IsPETase、TPADO、DCD dehydrogenase 这三种酶进行重组构建，最终形成多酶体系。该项目采用的融合蛋白基因工程技术已经出现 60 多年，并且许多文章已使用这样技术，如 Brandon C. Knott 等^[13] 构建了 MHETase:PETase 嵌合蛋白，发现相对于游离酶，嵌合蛋白具有更好的 PET 和 MHET 降解能力。这标志着该项技术已经逐渐趋于成熟。同时本项目采用了 SOE PCR 技术进行基因扩增，与传统 PCR 不同，SOE PCR 的引物需要设计重叠区域，从而使两个不同基因能够连接在一起。针对引物的设计，我们使用 SnapGene 软件对其所需基因设计了特定引物以此进行表达(图 2)，分别为 Is-F、Is-R、E6-F、E6-R。Is-F 和 E6-R 引物，通过 SnapGene 软件发现 Is-F 和 E6-R 不存在发夹结构并且其 Tm 和 GC 数值均在范围内，这表示其引物良好。但是 s-R、E6-F 虽然 Tm 和 GC 数值均在范围内，但由于加有刚性肽基因，因此引物存在发夹结构，但是 Is-F 和 E6-R 显示的自由能均均小于 4.5kcal/mol，因此不易产生引物二聚体，且 PCR 扩增产物完整，

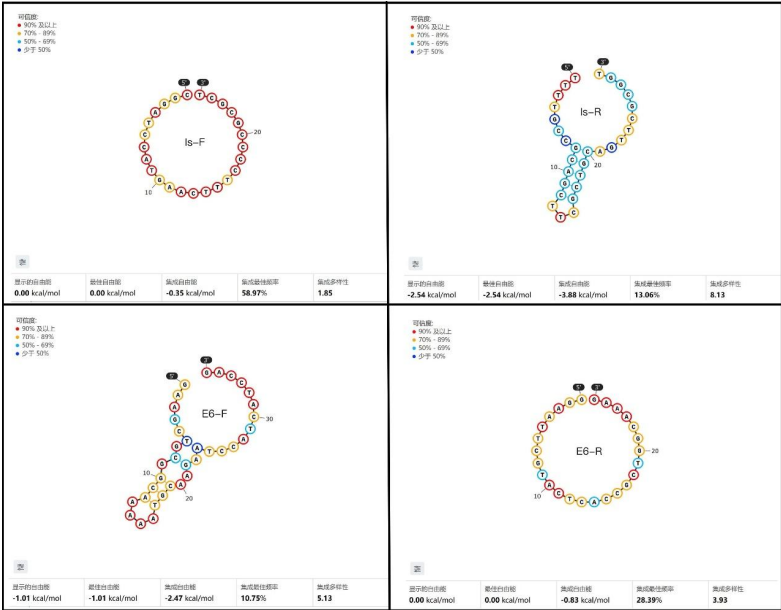


图 2 4 种引物结构

同时用 SnapGene 软件将成功构建出重组质粒 (图 3), 这表示四个引物设计较为合理。

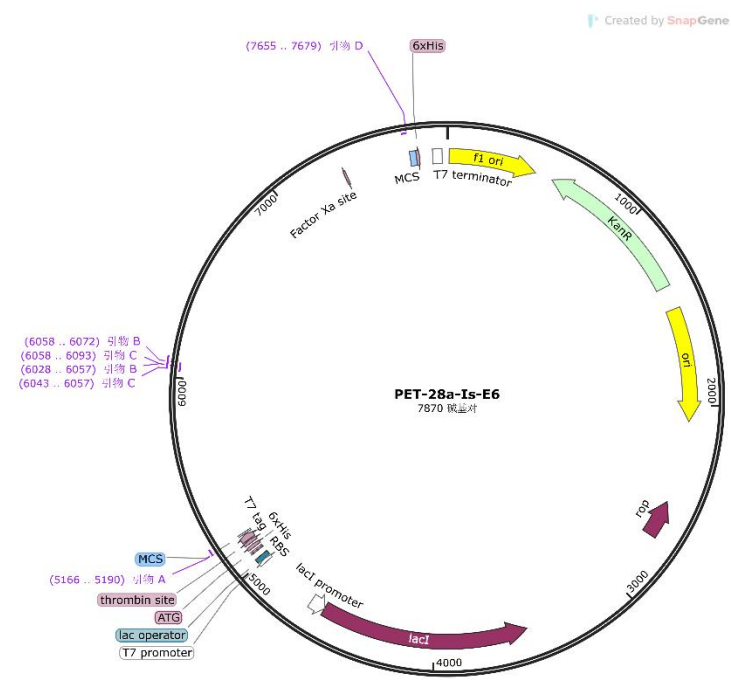


图 3 SnapGene 软件中构建的 pET-28a-Is-E6 质粒

2 创新性和特点

我们团队通过 PubMed、Web of science 等网站查询了关于塑料升级再造方面的相关文献，发现目前并无人在塑料升级再造方面使用三个酶组建的多酶体系，此外我们团队也尚且没有发现将这三个酶 IsPETase、TPADO、DCD dehydrogenase 进行重组。因此本项目针对 PET 塑料利用融合蛋白基因工程技术将三个降解 PET 所需要的酶进行了融合构建，从而构建了一个直接将 PET 分解为原儿茶酸的多酶体系。同时我们采用了刚性肽的连接方式将三个酶进行连接，这有利于这三个酶的功能域分开并保持它们的独立的功能。IsPETase、TPADO、DCD dehydrogenase 的多酶体系构建能够使 PET 不需要经过中间产物就能直接转化为我们所需的原儿茶酸 (PCA)。