

Rester

a Vitamin A cell factory

2022-Fudan



Contents

PART.1

Background

PART.2

Design

PART.3

Model



Background

Background



敏感肌

抗衰



“早C晚A”



VA的
化学工业合成

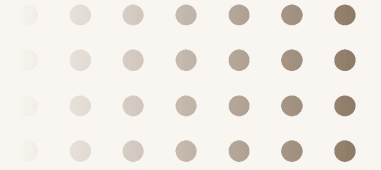
VA
细胞工厂
生物合成

新冠疫情口罩
导致的肌肤刺激



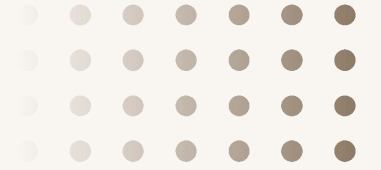
Design

Design-概述



- 在大肠杆菌中构建核酶辅助的多顺反子共表达生物积块：
利用自切核酶分离出 β -胡萝卜素生物合成途径所需的四个编码序列（crtE、B、I、Y）
- TEARS（转录工程可定位的RNA 液滴）提供基因表达的环境，使 *ybbO* 基因在其中过量表达视黄醛脱氢酶

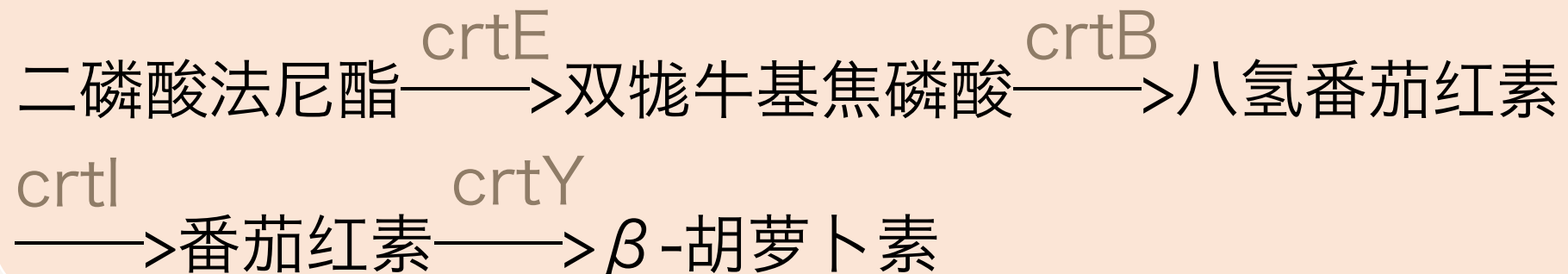
1) Design- ribozyme-assisted polycistronic co-expression system 核酶辅助的多顺反子表达系统



- 合成 β -胡萝卜素所需酶

β -胡萝卜素在哺乳动物中是VA的前体，是类胡萝卜素之一
crtE、B、I和Y是 β -胡萝卜素合成途径的关键酶

类胡萝卜素生物合成途径：



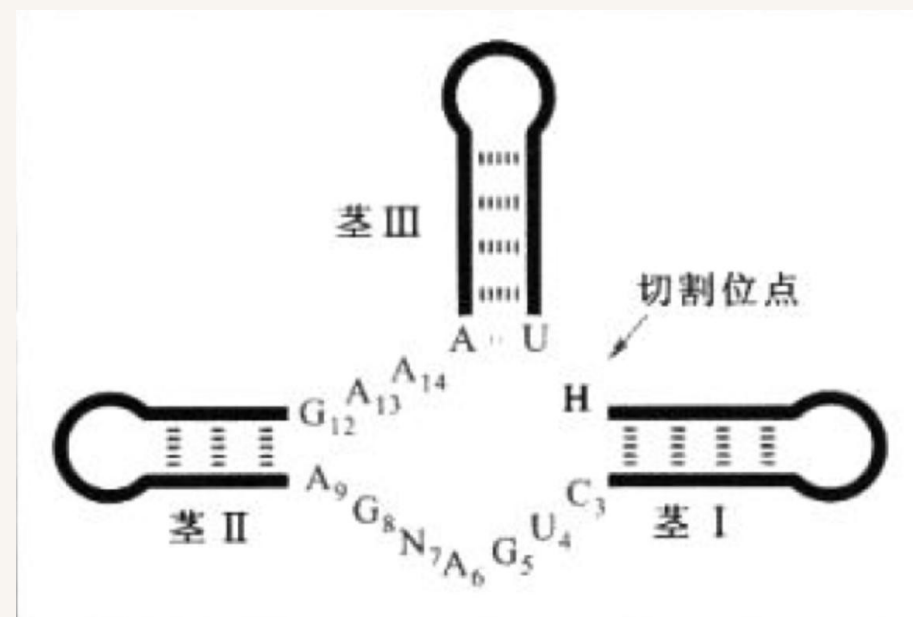
大肠杆菌可以自己合成二磷酸法尼酯，所以主要关注四种酶的生产

1) Design- ribozyme-assisted polycistronic co-expression system 核酶辅助的多顺反子表达系统



- 自身催化剪切型核酶-锤头型核酶

该酶的二级结构类似于锤头，由三个茎（由互补碱基构成的局部双链结构）构成，茎包围的核酶的催化中心由15个高度保守的碱基组成。核酶利用氢键、离子键和疏水作用产生催化区域，催化底物核苷酸序列裂解



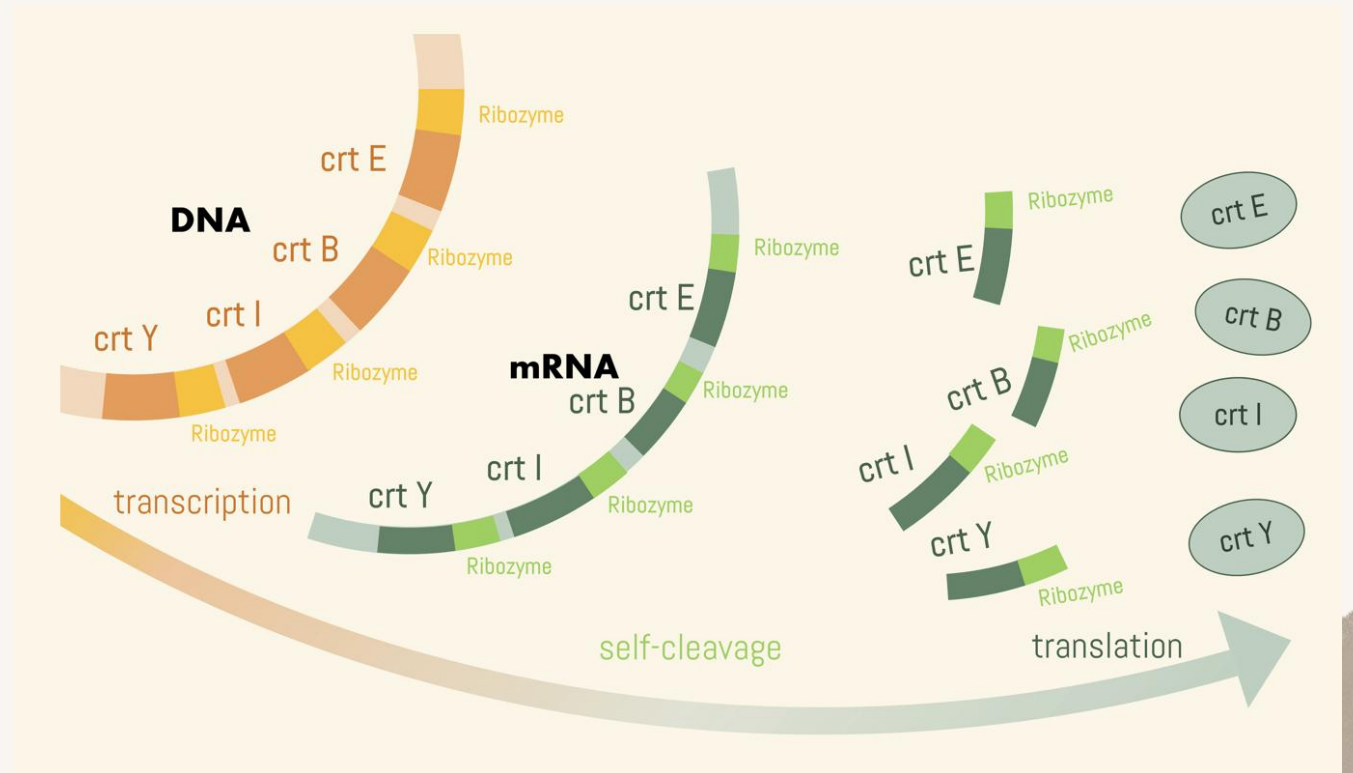
1) Design- ribozyme-assisted polycistronic co-expression system 核酶辅助的多顺反子共表达系统

- 2016 Glasgow: crtEBIY是通过K118014 (RBS+crtE) 、K118006 (RBS+crtB) 、K118005 (RBS+crtI) 和K118013 (crtY) 的标准BioBrick组件创建的
- 其存在的弊端: crtEBIY是一个启动子下有多个顺反子的编码序列, 下游基因的表达比启动子旁的第一个基因低得多; 另外, 上一个编码基因的尾部可能会干扰到下一个编码基因的RBS, 影响了RBS与核糖体结合, 从而影响下游被翻译出的蛋白较上游的少

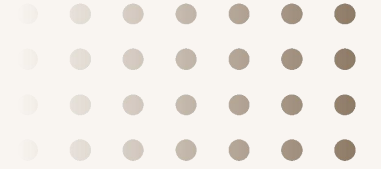
1) Design- ribozyme-assisted polycistronic co-expression system 核酶辅助的多顺反子共表达系统

- Fudan的改进:
在crtEBIY之间插入核酶序列构建核酶辅助的多顺反子共表达系统

在每个酶的ORF（开放阅读框）插入一段锤头型核酶序列，转录成mRNA后，锤头型核酶就会催化裂解，形成一段段单顺反子的mRNA序列，避免了多顺反子序列之间的相互干扰，让四个酶的表达水平都差不多，也可以人为调整每个基因RBS的强度，更加精准管理该共表达系统



2) Design- TEARS



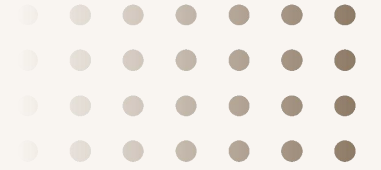
BCMO

YBBO 醛还原酶

β -胡萝卜素 $\xrightarrow{\text{BCMO}}$ A 醛 (视黄醛) $\xrightarrow{\text{YBBO 醛还原酶}}$ A 醇 (视黄醇/VA)

- BCMO蛋白：是一种 β -胡萝卜素加氧酶，可以在 β -胡萝卜素中间切割，形成两个视黄醛
- ybbO基因：编码 β -胡萝卜素醛还原酶，醛还原酶在NADPH的协助下将视黄醛转化为视黄醇

2) Design- TEARS

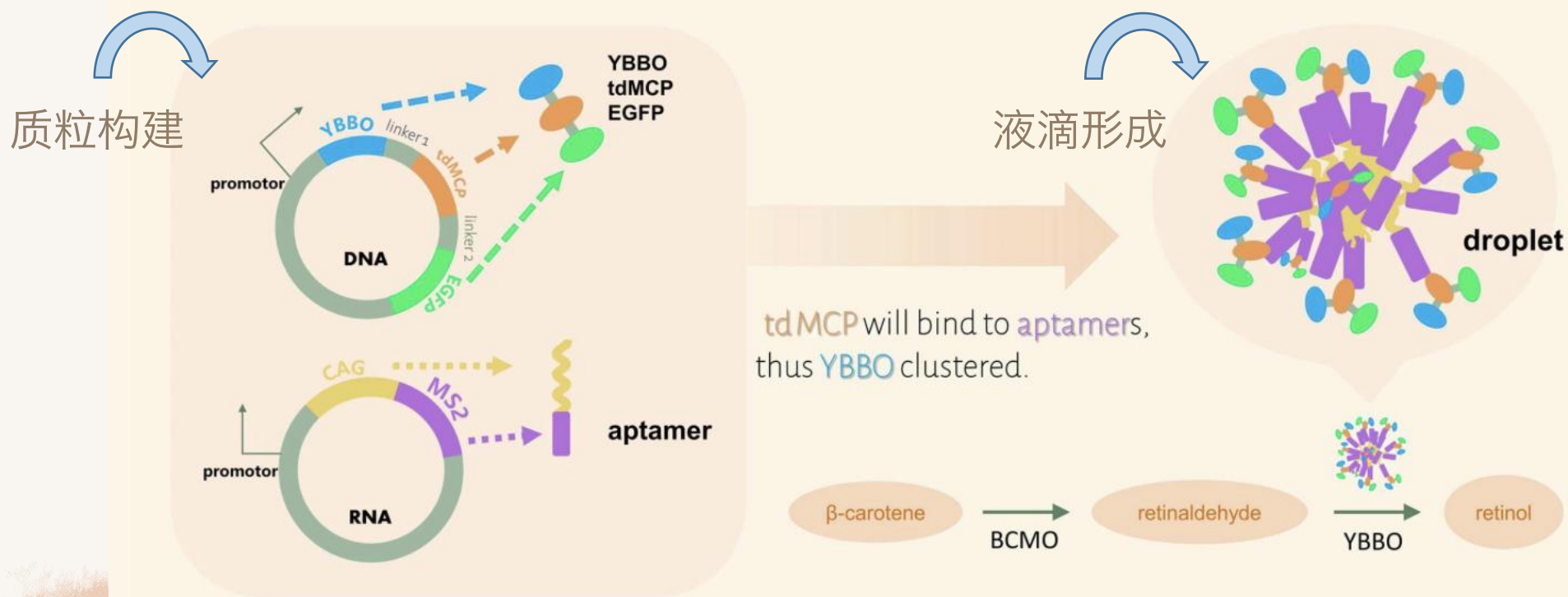


- 为缺少细胞器的原核细胞而设计的TEARS
(Transcriptionally Engineered Addressable RNA Solvent droplets) 是一种无膜细胞器，由RNA结合蛋白招募结构域融合到聚CAG重复序列中组装而成，这些重复序列自发地驱动从本体细胞质的液-液相分离。
TEARS提供了类似细胞器生物过程隔离，用于隔离生化途径，控制代谢分支点，缓冲mRNA翻译速率，构建支架蛋白质-蛋白质相互作用。
- 液-液相分离 (LLPS) 就像油和水倒在一起不相融一样，是细胞形成无膜细胞器的物化基础

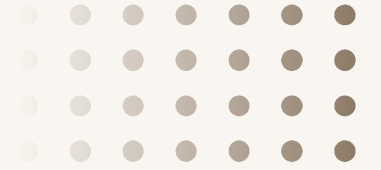
2) Design- TEARS

TEARS的结构组成:

MS2蛋白（一种RNA结合蛋白）的招募结构域、tdMCP蛋白的结合结构域和CAG重复序列

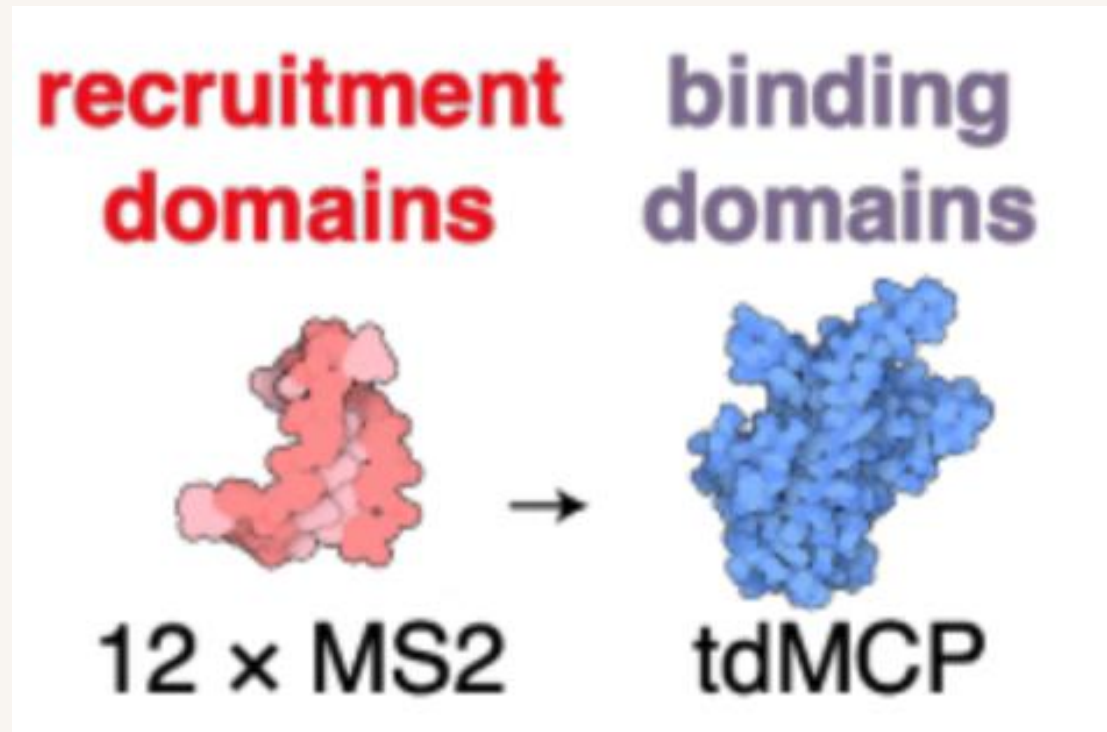


2) Design- TEARS



TEARS的结构组成:

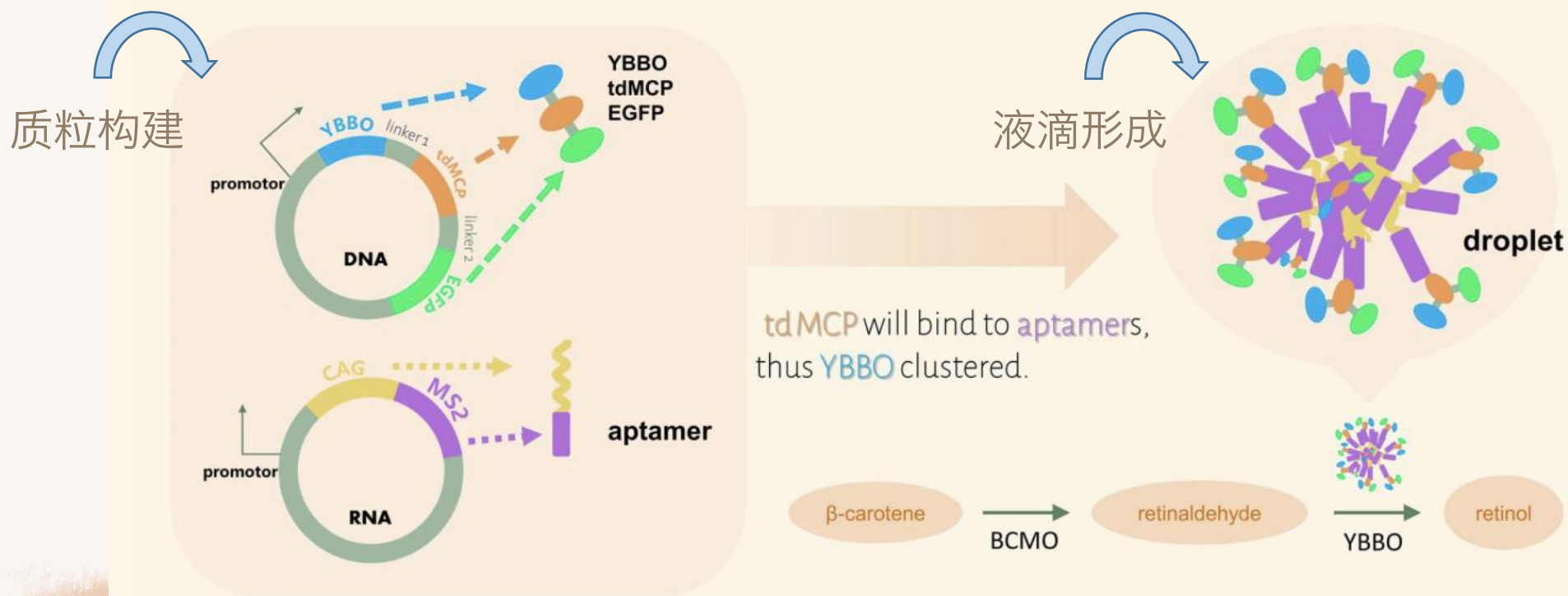
MS2蛋白（一种RNA结合蛋白）的招募结构域、tdMCP蛋白的结合结构域和CAG重复序列



2) Design- TEARS

TEARS的结构组成:

MS2蛋白（一种RNA结合蛋白）的招募结构域、tdMCP蛋白的结合结构域和CAG重复序列





Model

Model



- 建模目的：确定液-液相分离并浓缩还原酶是否有效
- Diffusion model
 - 1) the Cahn-Hilliard Equation
描述多相系统的非线性微分方程，它可以用来模拟多相系统中的相变过程
用于模拟TEARS与细胞质的相分离过程
 - 2) the Michaelis-Menten Equation
酶促反应的起始速度与底物浓度关系的速度方程
用于计算并比较相分离前后的酶促反应速率，说明了相分离促使的醛还原酶的浓缩能够大幅提高反应速率



THANKS