2021-DTU-CHINA

0 项目背景

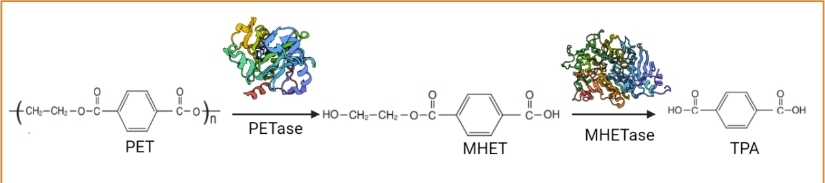
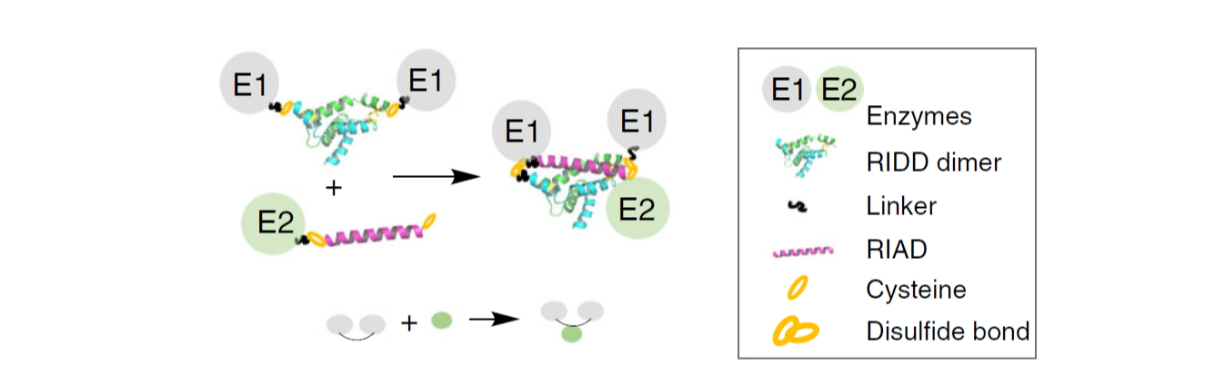
PET塑料在世界范围内的广泛应用带来了严重的环境挑战，引起了人们的广泛关注。2016年，有研究发现微生物Ideonella sakaiensis能够在温和的温度下分泌两种有效的酶（PETase and MHETase）来分解PET聚合物(如图1)。然而，中间体MDET会占据PETase的活性位点，抑制PETase的工作，因此这种双酶体系的降解能力严重地被中间体的扩散速率等因素限制，且通过蛋白质的定向进化可能不适合降解速率的进一步提升。这项工作通过生物合成工厂和自然界中并不存在的、人工设计的蛋白质系统来促进PET降解。

图1 PET的降解路径

1 项目原理

为了降低MHET对PETase的抑制作用，消除MHET在反应介质中的积累，以更快的速度降解PET薄膜，该团队设计了一种精细的多结构域蛋白质系统，其中PETase和MHETase在彼此位置附近构建，具有高度的协同关系，以提高整个PET塑料降解速率，同时，该团队还引入了一种疏水蛋白（hydrophobin4），可能有利于该复合体在塑料表面的粘附和聚合物理化性质的改变。

构建复合物的过程中，RIDD和RIAD分别来源于PKA和AKAP，这两段短肽可以实现紧密的结合并且由于肽段较短，可以尽量避免对原有酶活性和结构的影响。（图2）



该团队最终构建的蛋白质结构如图所示，（图3），并尝试利用该复合物有效降解PET塑料。

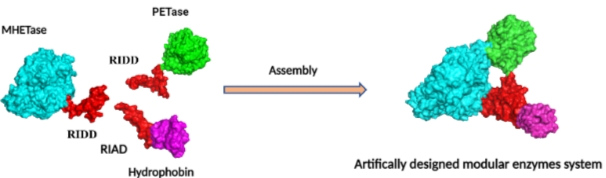
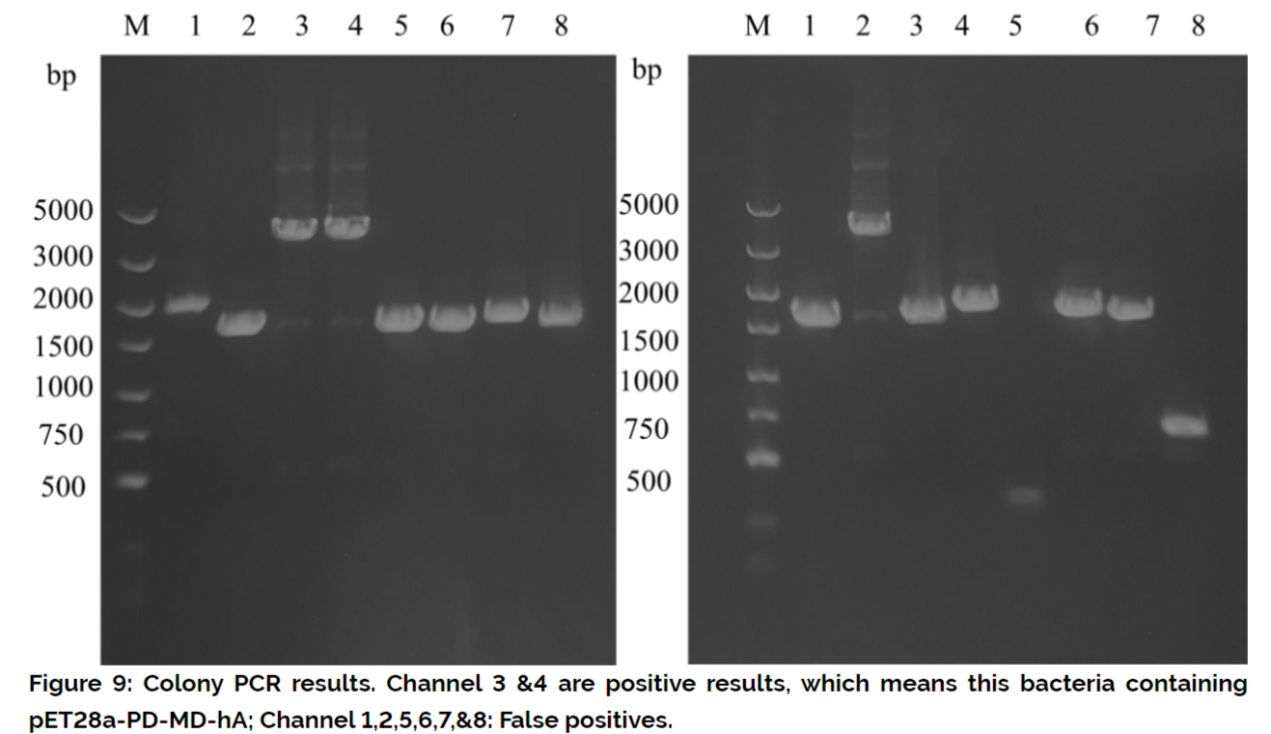
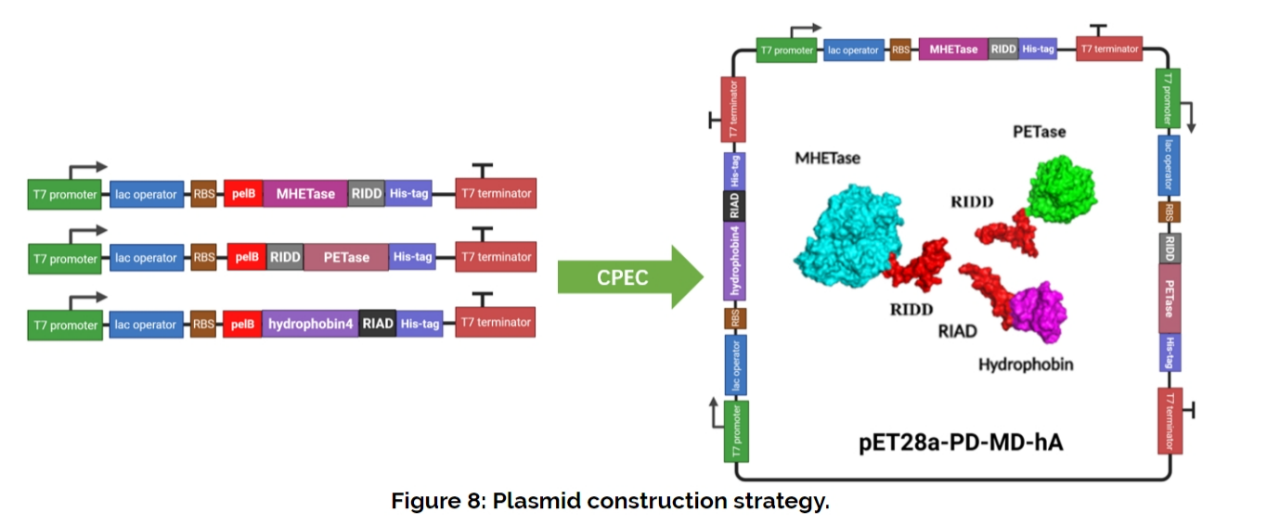
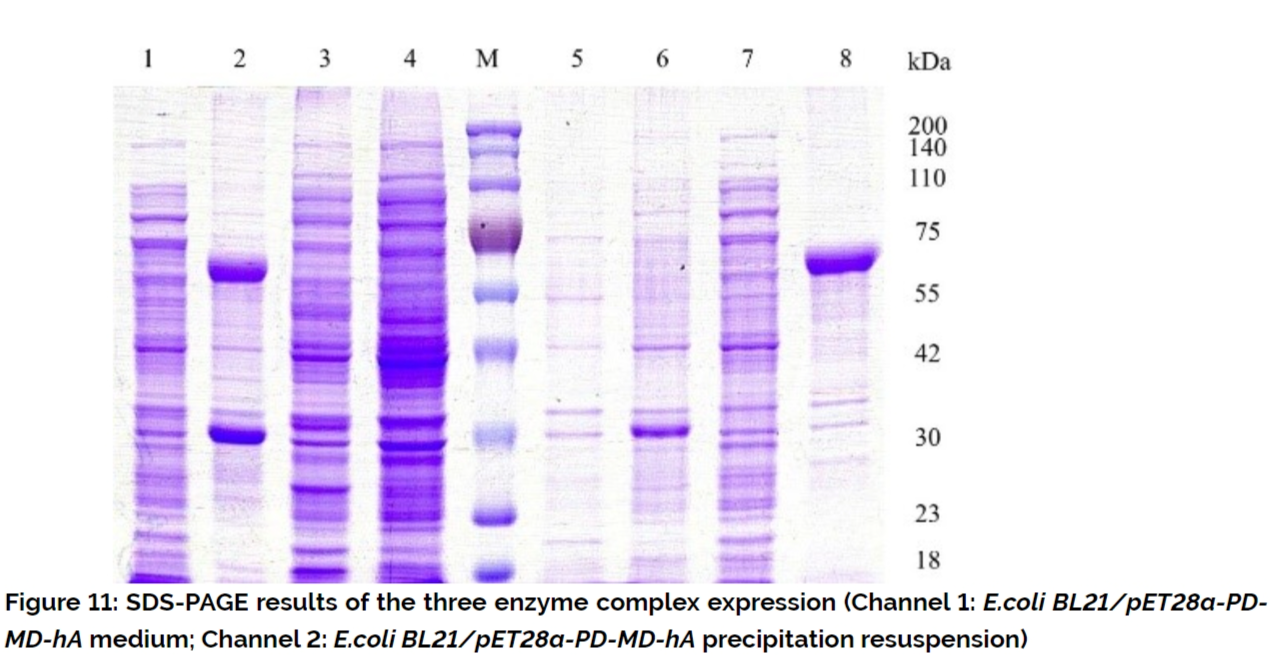


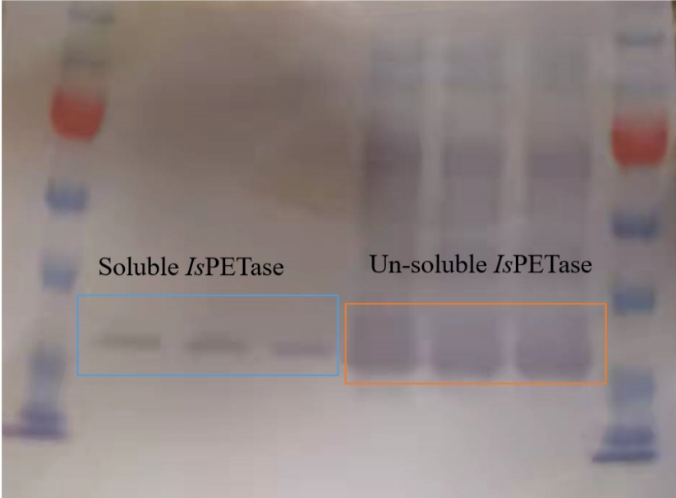
图3 新设计的蛋白质模式图

2实验结果

这是最终的基因路线，MHETase和疏水蛋白4在碳端连接RIDD和RIAD，IsPETase则在氮端连接，为了便于分离纯化加入了组氨酸标签。为了使三种蛋白的分泌量接近1：1：1，该团队选择将三段基因整合到一个质粒上。

如图是菌落PCR的结果，通道3，4为阳性。代表该细菌中包含了上图所示的质粒。

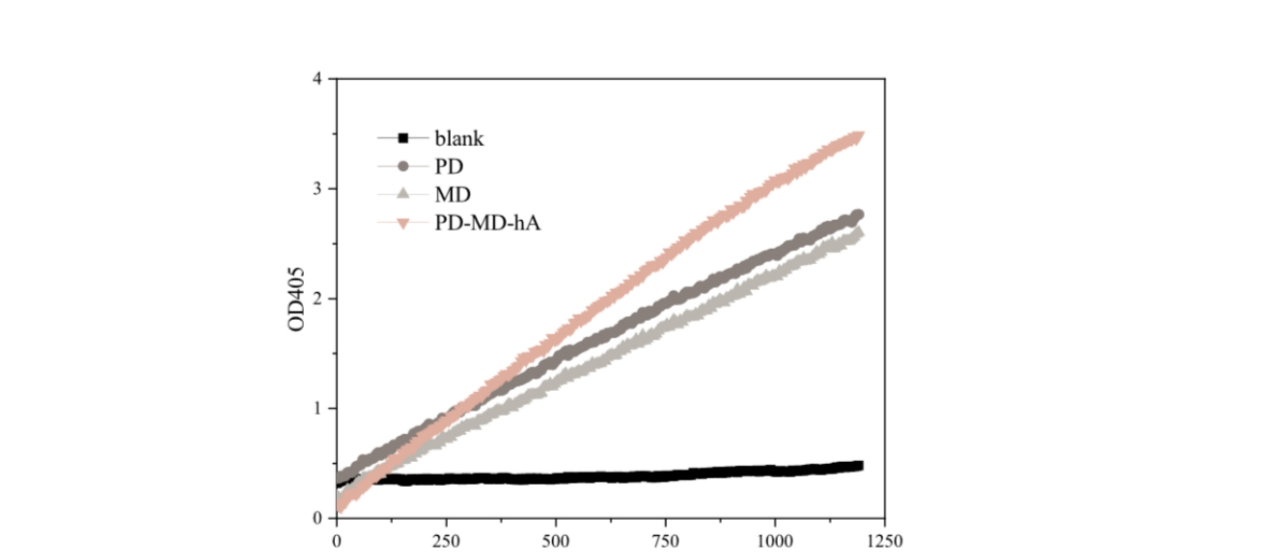
经过电泳，结果如图所示（RIDD-PETase 32kDa RIDD-MHETase 68kDa 疏水蛋白4仅有11kDa t图中无法显示）其中通道1为该细菌培养基，通道2为沉淀重悬。结果表明沉淀中含有过量的RIDD-PETase和RIDD-MHETase。这是由于pelB信号肽对后续肽段的疏水性有要求，RIDD肽段和MHETase肽段疏水性不一致导致靶蛋白的分泌过程受阻。



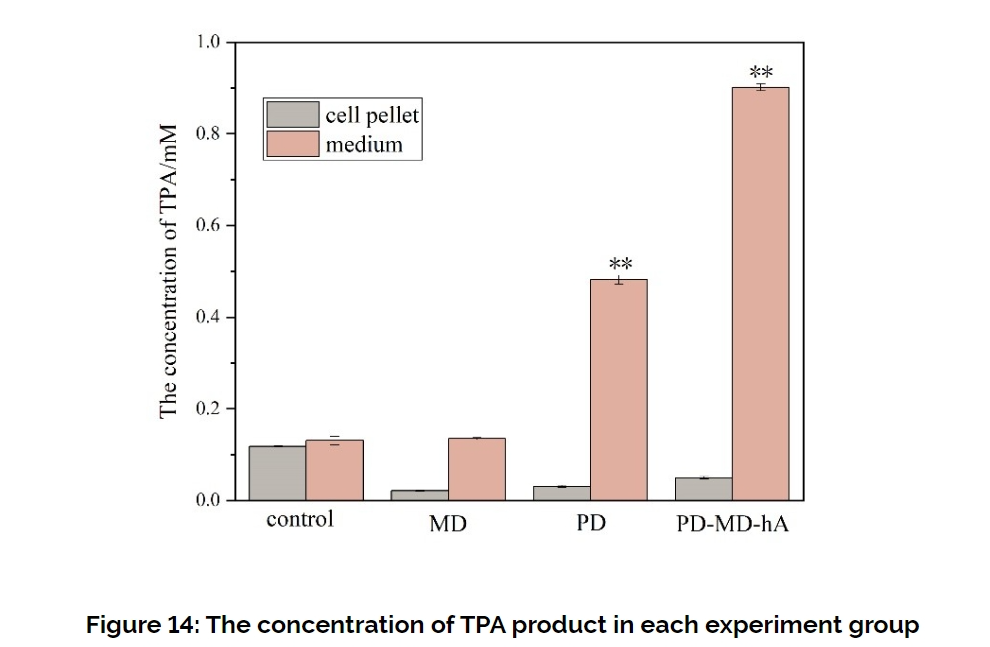
蛋白质免疫印迹实验表明，尽管分泌过程受阻，仍然有少部分RIDD-PETase被分泌到培养基中，因此该培养基仍然可以视作粗酶溶液。

由于PET塑料降解需要较长的时间，因此他们参考了iGEM 2016 Harvard BioDesign团队的方法，使用pNPB（酯酶的通用底物）测量酶活性。在pNPB酯酶反应下，可生成对硝基苯酚，在405 nm处具有较强的吸收峰。在设定的时间段内，pNPB和酶溶液混合物在405nm处的吸光度越高，对硝基苯酚的产率越高，酶活性越大。

以大肠杆菌BL21/pET28a-PD-MD-hA培养基为粗酶溶液，测定酶活性。为了控制变量，本实验中粗酶溶液的体积与先前测定RIDD-PETase粗酶溶液和RIDD-MHETase粗酶溶液时使用的体积相同。酶活性测定曲线如图9所示。

不难得出结论，PD-MD-hA的斜率高于PD或MD，这表明大肠杆菌BL21/pET28a-PD-MD-hA的培养基作为粗酶溶液具有酯酶活性。此外，对硝基苯酚的最终浓度高于单独使用两种酯酶的浓度，这表明三酶复合物的构建成功。

最终PET降解实验结果如图（检测产物TPA的浓度）



3评价

将参与一个化学过程的两种酶直接连在一起尝试消除中间体扩散速率对于反应速率的阻碍作用使一个非常有趣的思路。并且目前塑料垃圾的降解也是一个比较重要的话题。

这个项目最后的结论其实有点偷换概念的感觉，毕竟对照组是只有MD和PD的体系，而不是两者混合体系。并且实验似乎也没有直接证据生成了最初规划的蛋白复合物。

Nominated for Best Environment Project