PET 2 protein

0项目背景

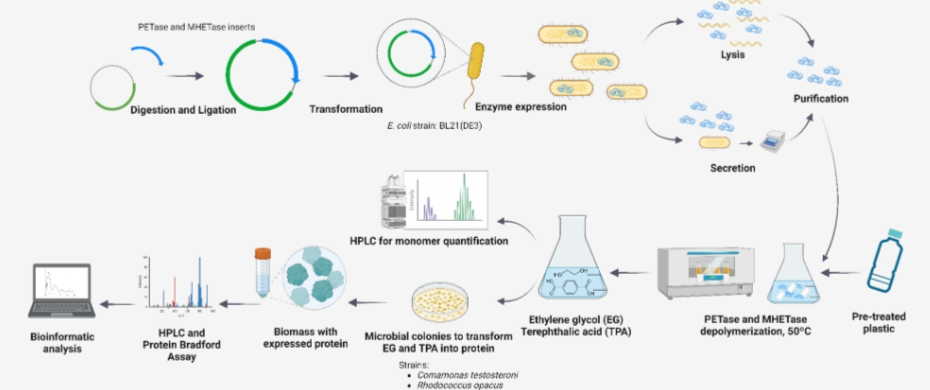
大致和上一个相同，PET塑料垃圾较多。此外，世界上的粮食短缺现象仍然严重（不作过多赘述）

Schaerer， L. G. 等人已经探索了使用PET塑料作为碳源，利用微生物生产食用蛋白的可行性。

1项目原理

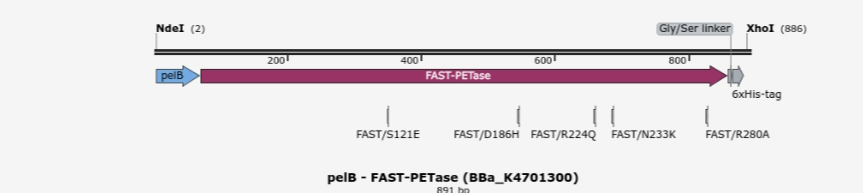
该项目想要开发一种概念验证方法，将PET塑料转化成为可食用的蛋白质。这个项目大体可以分为3步。

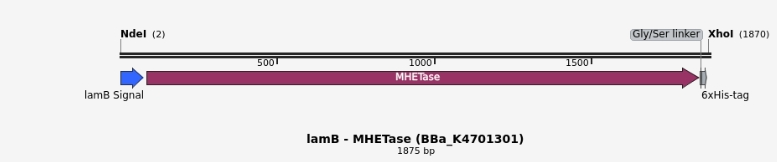
第一步是将PETase和,MHETase相关基因转入大肠杆菌中以生产并分泌这两种酶。（上一个介绍的项目由于插入短肽的影响在这一步并没有成功）第二步是将这些分泌出的酶和PET塑料混合并降解。第三步是利用微生物将EG和TPA转化成蛋白质，之后通过脱水分离出蛋白质。第三步选择的两种菌株分别是Comamonas testosteroni, and Rhodococcus opacus。



1 PET解聚

2022年的研究表明，原有酶的一种变体FAST-PETase可以更加有效地降解PET，故转而将该变体引入大肠杆菌细胞内，仍然使用pelB信号肽使其被分泌到细胞外。

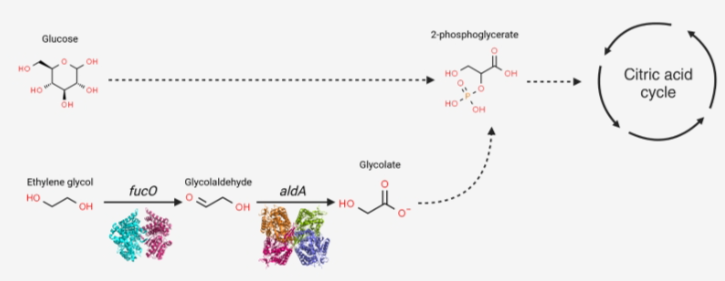


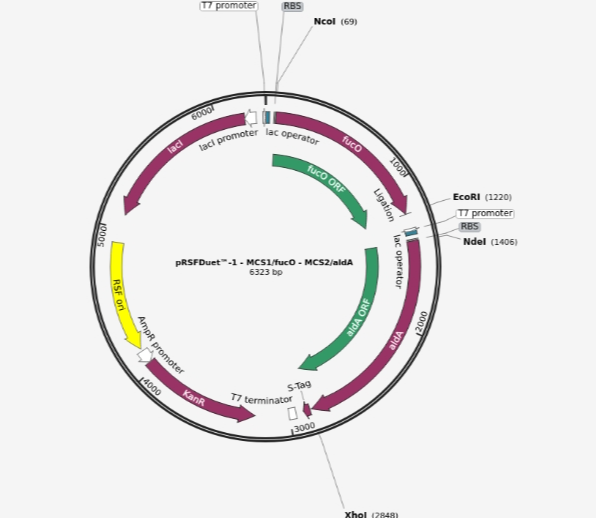


由于PET降解反应的决速步并不是这一步，对于MHETase序列的改动显得并不是那么重要。此处的信号肽选用了lamB，因为pelB未能使得MHETase正常分泌。

2 EG的同化设计

该团队设计将两个基因（fucO和aldA）导入大肠杆菌的细胞中，乙二醇在这两种酶的催化下发生下图转化变成乙醇酸，之后通过一系列步骤合成2-磷酸甘油酸，参与柠檬酸循环过程。



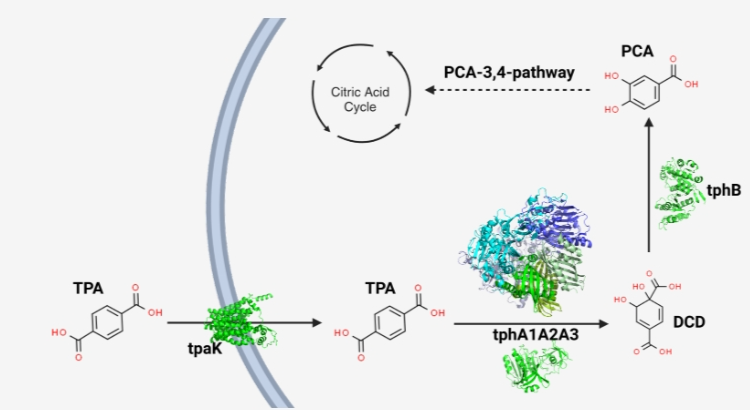


这是实验中设计的质粒结构，仍然采用可以用IPTG激活的T7启动子。由于中间产物2-羟基乙醛对大肠杆菌可能有害，为了便于转录速率的控制，将两个基因导入到一个质粒中。

在评估翻译速率对于最终蛋白质生成的影响时，该团队用Salis实验室的RBS计算器和计算得知fucO和aldA的翻译速率在相对单位下分别为81600和3000。为了平衡这一差距，研究团队利用Vienna RNAfold计算了核糖体结合位点附近RNA折叠的delta-G，并向编码序列5’端引入突变，最终将翻译速率分别调整到了29400和10600左右。

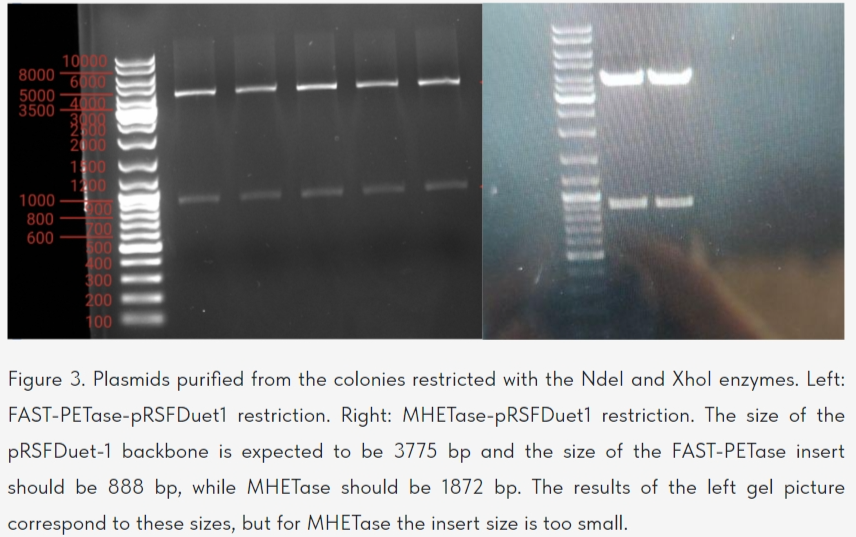
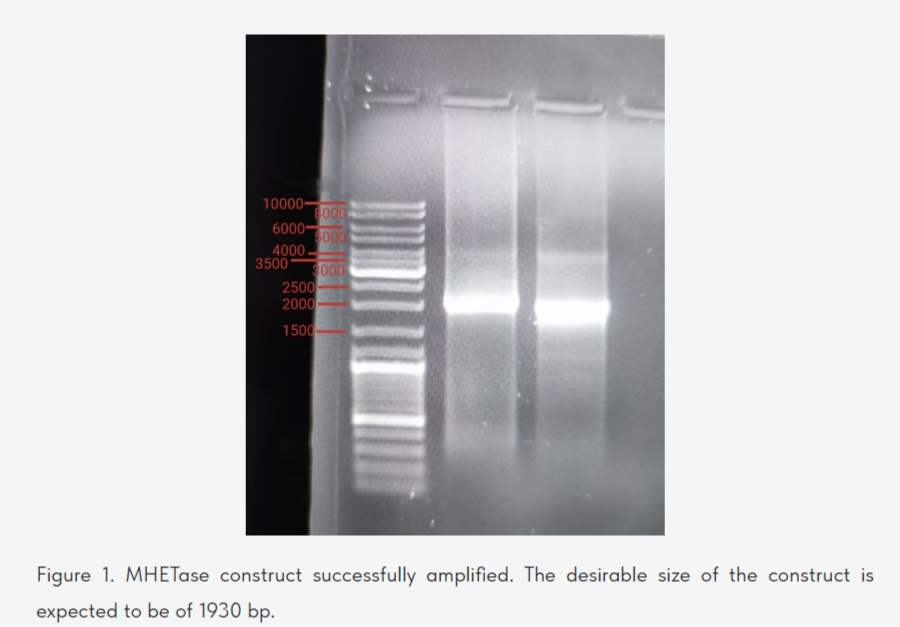
3 TPA的同化设计

除了利用本来就可以同化TPA的野生菌种外，研究团队还尝试了对Pseudomonas putida KT2440设计操纵子，包括5种相关基因（1种转运蛋白和4种不同的酶，如下图所示），其主要部件均来自Comamonas testosteroni，其中，由于tpaC没有办法在这种细菌的体内合成，故利用来源于Rhodococcus opacus 的tpaK替换。

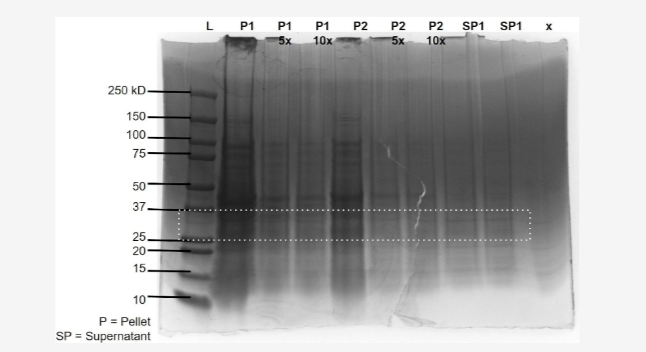


2 实验结果

由于时间原因，关于EG同化和TPA同化的工作并没有完成湿实验中的组装。



上两幅图是对于从菌落中得到的质粒利用两种内切酶分析，电泳的结果显示没有发现MHETase，说明MHATase的构建过程正常进行，但是转化过程受阻。（左FAST-PETase右MHETase）



最终，30kDa左右出现的条带表明FAST-PETase可能正常分泌到了培养基中。

该团队通过将化学和热预处理的PRT塑料添加到表达宿主的生长培养基中进行了塑料解聚实验。但是没有观察到质量损失，很可能是由于酶分泌方面存在问题。

3评价

这个研究的整体设计思路较为新颖，并且这个转化链的设计很长，从塑料垃圾到食物，看起来有很大的应用价值。但是这个项目的完成度实在是太低了。PETase生产出来但是没有效果，MHETase没有做出来，EG和TPA的后续利用都没有进行实验。

Nominated for Best Environment Project，Best Human Practices，Best Wiki，Best Education