

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：探究茎环结构在自剪切核酶多顺反子表达系统中抑制
mRNA 降解的作用

姓 名：王奕钧 学 号：20307110021

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：蔡亮 职 称：研究员

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期：2024 年 05 月 19 日

探究茎环结构在自剪切核酶
多顺反子表达系统中抑制 mRNA
降解的作用

完成人

王奕钧

指导小组成员

蔡亮 研究员

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、前 言.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 立题依据.....	1
1.3 实验假设.....	4
1.4 实验设计与技术路径.....	5
二、材料与方法.....	8
2.1 材料.....	8
2.1.1 大肠杆菌菌株.....	8
2.1.2 质粒载体.....	8
2.1.3 引物序列.....	8
2.2 试剂.....	9
2.2.1 LB 培养基	9
2.2.2 SOC 培养基.....	10
2.2.3 PBS 缓冲液 (pH 7.4).....	10
2.3 实验方法.....	10
2.3.1 质粒小抽.....	10
2.3.2 酶切.....	11
2.3.3 胶回收.....	11

2.3.4 ClonExpress 无缝克隆连接	12
2.3.5 重组产物转化.....	12
2.3.6 点突变 PCR.....	13
2.3.7 鉴定重组或点突变所得菌落.....	14
2.3.8 酶标仪测量大肠杆菌 GFP/RFP 荧光强度	14
2.4 实验软件.....	15
三、研究结果.....	16
3.1 分子克隆.....	16
3.1.1 茎环结构设计.....	16
3.1.2 质粒构建.....	19
3.2 基因表达量与所在 mRNA 的 3'茎环最低自由能无关.....	21
3.3 串联茎环结构无法叠加 mRNA 稳定性	24
3.4 复杂的假结结构不一定能稳定 mRNA	25
3.5 改变茎环结构调节 β -胡萝卜素合成途径	26
四、讨 论.....	30
4.1 科学意义.....	30
4.2 结果讨论.....	30
4.3 存在问题及研究展望.....	32
参考文献.....	34
致 谢.....	37

摘要

在生物工程领域，通常需要在原核生物中精确调控多个基因，目前常使用多顺反子系统，即在单个启动子下调控多个基因，但由于核糖体翻译时会发生脱落，可能导致上下游基因表达量不均衡。为了解决这一问题，在核酶辅助的多顺反子共表达 (pRAP) 系统中自剪切核酶被插入基因之间，使得多顺反子会自剪切形成单顺反子，每个单顺反子都有独立的核糖体结合位点 (RBS) 能高效起始翻译。在 pRAP 系统中，在蛋白编码序列下游插入茎环结构，可以保护剪切后非末位 mRNA 的 3' 端不被核酸外切酶降解，因此可用作调控基因表达的元件。

本研究提出假设：位于蛋白编码序列的 3' 茎环最低自由能越低，稳定 mRNA 的效果越好。本研究使用简化的 pRAP 系统，将 GFP 和 RFP 作为系统中的表达蛋白，改变 GFP 下游茎环序列，通过比对荧光强度来衡量基因表达量。

研究结果显示茎环结构热力学稳定性 (最低自由能)、茎环长度 (串联)、假结结构与其所在 mRNA 的稳定性都不存在明显关联。因此 3' 茎环结构可能通过诸多因素来影响 mRNA 稳定性，而非仅包括热力学稳定性、长度或结构。本研究进一步使用茎环成功实现了调节大肠杆菌中 β -胡萝卜素的合成。

本研究意义在于，为在 pRAP 系统中通过茎环定量调节 mRNA 稳定性提供了实验数据，在生物工程等领域中具有广泛的应用前景。

关键词： 茎环结构，mRNA 稳定性，最低自由能，核酶，多顺反子共表达系统

Abstract

In bioengineering, it is crucial to regulate the expression of multiple genes in one prokaryotic system with high precision. The conventional approach typically uses polycistronic systems to regulate multiple genes under a single promoter; however, this can lead to an imbalance between upstream and downstream genes due to ribosome drop-off. In the Ribozyme-Assisted Polycistronic co-expression (pRAP) system, self-cleaving ribozymes are inserted between the coding sequences. During transcription a single polycistronic mRNA is self-cleaved into multiple mono-cistrons, allowing efficient translation initiation. In this system, the stem-loop downstream of the protein-coding sequence protects the 3' ends of mRNA from degradation, serving as a regulatory element for gene expression.

This study hypothesizes that the stem-loop structure with lower minimum free energy (MFE) has higher mRNA stability. To test the hypothesis, GFP and RFP were placed in the first and second positions of the pRAP system, respectively. By altering the stem-loop structure downstream of GFP, we monitored the stem-loop's ability to stabilize mRNA by comparing the fluorescence intensity ratio.

The experimental results show no correlation between the thermodynamic stability of the stem-loop, the stem-loop length (tandem), or the pseudoknot structure and the mRNA stability. This study suggests that the 3' stem-loop structure may affect mRNA stability through multiple factors. This study further modified the stem-loop to achieve regulation of β -carotene synthesis in *E. coli*.

This study provides the first evidence of quantitative regulation of mRNA stability by stem loops in pRAP, offering practical applications in bioengineering and related fields.

Key words : stem-loop, mRNA stability, minimum free energy, ribozyme, polycistronic co-expression system

一、前言

1.1 研究背景

在生物工程领域，通常需要在原核生物中同时调控多个基因的表达，例如合成一条代谢通路中的多种酶，构成级联反应，以获得终产物^[1]。为了实现基因表达的精确调控，满足工程生产的需求，我们需要解决两个问题：①如何同时、高效表达多个蛋白；②如何调节蛋白的表达水平，以保证细胞内代谢通量平衡，减少由于限速步骤造成的中间产物堆积，从而避免造成细胞代谢压力。

针对在原核体系内同时高效、表达多个蛋白这一问题，通常会采用三种策略：①多质粒系统：将多个基因分别插入不同的质粒载体，多个质粒同时转化入同一个大肠杆菌中，这种方法存在缺陷，包括转化效率低、载体上要求携带不同的抗性基因、细菌容易丢失质粒^[1]；②多启动子系统：在同一个质粒中用多个启动子 (promoter) 分别调控多个基因，每个启动子下转录出一条含有单个蛋白编码区域 (coding sequences, CDS) 的 mRNA，这种方法的主要缺陷包括不同启动子转录水平上的波动会对蛋白质的相对表达水平有较大的影响^[2]；③多顺反子系统：在同一个表达单元中，即一对启动子和终止子 (terminator) 之间含有多个基因，转录出的 mRNA 含有多个蛋白编码序列，即多顺反子 (polycistron)，该系统的优点包括最大程度缩短载体长度、转录水平相对可控。然而这种方法也存在缺陷，核糖体在翻译含有多个蛋白编码序列的 mRNA 时，由于外源蛋白高水平表达可能造成氨基酸不足、氨酰 tRNA 耗竭，因此核糖体有一定概率会从多顺反子 mRNA 上脱落，下游基因表达量低，从而造成上下游基因表达量不均衡^[3]，难以实现蛋白表达水平的调控。

1.2 立题依据

为了在原核生物中同时表达多个蛋白，且解决多顺反子系统上下游基因表达量不均衡的问题，2023 年复旦大学林金钟课题组开发了核酶辅助的多顺反子共表达系统 (Ribozyme-Assisted Polycistronic co-expression system, pRAP)^[4]。将自剪切核酶 (self-cleaving ribozyme) 插入蛋白编码序列之间，在转录的同时，单个多

顺反子 (polycistron) mRNA 会被核酶剪切, 分离成多个仅含有唯一蛋白编码序列的单顺反子 (monocistron), 每个单顺反子 mRNA 的 5'端具有核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS), 可以高效地起始翻译 (如图 1)。

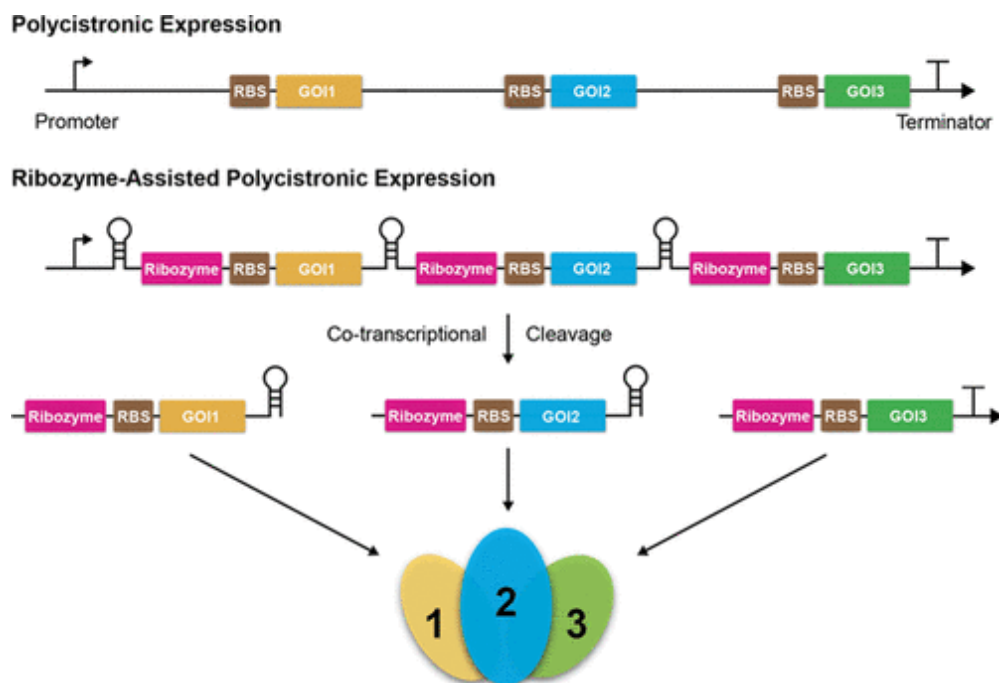


图 1. 核酶辅助的多顺反子共表达系统机制示意图 (图片来源于文献^[4]Figure 1.)

一个启动子下转录出的多顺反子 mRNA 包含三个蛋白编码序列 (GOI1/2/3, 分别为黄色/蓝色/绿色), 在多顺反子 mRNA 转录的同时被自剪切核酶 (Ribozyme, 品红色) 切割成多个单顺反子, 每个单顺反子通过 CDS 的 5' 上游核糖体结合位点 (RBS, 棕色) 高效起始翻译, CDS 的 3' 下游为茎环结构保护单顺反子不被核酸外切酶降解

系统中起到关键作用的核酶是具有催化功能的非编码 RNA。核酶最早在 1982 年被 Thomas Cech 在四膜虫中首次发现 (rRNA 前体能自我催化剪切)^[5]。当年, Sidney Altman 在获悉了 Cech 的研究后, 马上检查自己研究的核糖核酸酶 P, 发现也是 RNA 成分、也能切断前体 tRNA^[6], 后续还发现 mRNA 也是依靠核酶催化成熟^{[7],[8]}。1989 年两人一同凭借对于核酶的研究工作获得了诺贝尔化学奖。天然的核酶可以分为四类: 异体催化的剪切型、自体催化的剪切型、内含子自我剪接一型、内含子自我剪接二型。在 pRAP 系统中使用的自剪切核酶属于自体催化的剪切型。其作用机制为: 碱使得核苷酸 2'羟基去质子化, 原羟基中的氧亲核性增加, 进攻附近的磷, 酯交换反应通过磷烷过渡态或中间态进行, 因在上游核苷酸中产生 2', 3'-环磷酸根 (2', 3'-cyclic phosphate, 2', 3'-cP), 而在下游核苷酸上产生 5'-羟基, 磷酸二酯键断裂而剪切完成^[9]。

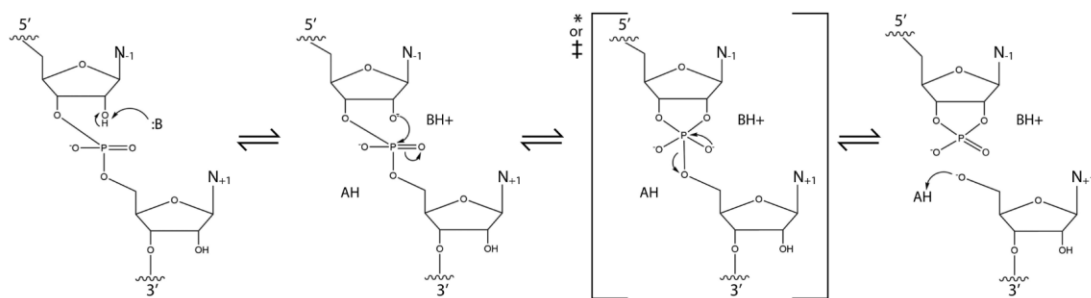


图 2. 核酶自剪切化学机制 (图片来源于文献^[9]Figure 1.)

碱 (:B) 使得核苷酸 2'羟基 (OH) 去质子化, 亲核性增加的氧, 进攻附近的磷, 酯交换反应通过磷烷过渡态或中间态进行, 最终在上游核苷酸中产生 2'-3'环磷酸根基团, 在下游核苷酸上产生 5'-羟基 (OH)

根据不同的辅助因子、结构、剪切位点, 可将自剪切核酶再进行分类。其中的 Twister 是 2014 年被发现的一类核酶^[10], Twister 核酶的命名遵循核苷酸链起始和结束的茎环 (例如从 P1 茎环处起始与结束的 Twister 核酶被称为 Twister P1), 其具有很高的剪切效率^[11]。

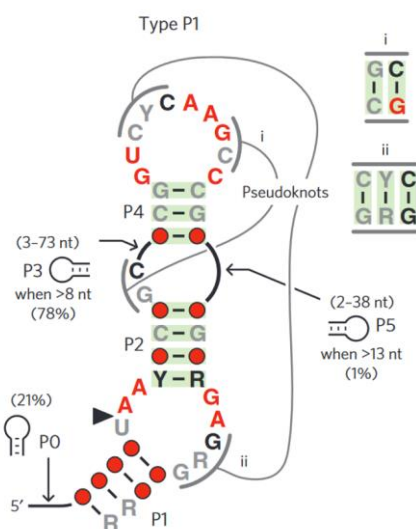


图 3. 自剪切核酶 Twister 保守序列与二级结构 (图片来源于文献^[10]Figure 1a.)

以 Twister P1 构型为例, RNA 链在 P1 茎环基部开始和结束, 黑色三角箭头指示裂解位点。灰色、黑色和红色核苷酸分别表示至少 75%、90%和 97%的保守性; 绿色阴影表示的预测三级结构碱基对。括号中的数字是连接序列的可变长度, 有时会形成茎结构。R 和 Y 分别表示嘌呤和嘧啶

使用核酶辅助的多顺反子共表达系统, 虽可同时高效表达多个蛋白, 还需要优化以调节系统中不同蛋白质的表达水平。解决该问题可以利用 pRAP 系统中两个调节因子:

- ◆ 核糖体结合位点 (RBS): 位于蛋白编码序列 5'上游的 mRNA 序列, 可以通过调节核糖体与 mRNA 的结合强度而影响翻译起始效率;
- ◆ 茎环结构 (stem-loop): 可以发生内部碱基配对的 RNA 序列, 在该系统中位于蛋白编码序列 3'下游。在大肠杆菌中, 降解 RNA 的核酸外切酶 (多核苷酸磷酸化酶 PNPase、RNase II) 以 3'-5'方向降解为主, 且难以切割具有复杂二级结构的 RNA^[12]。其中 RNase II 承担了 *E. coli* 中 95~98% 的 3'-5'核酸外切酶活性^[13], 不仅能降解常规 RNA 的 3'-OH, 还能降解 2', 3'-环磷酸根^[14]。在 pRAP 系统中, 核酶发生自剪切后, 仅有最后一个单顺反子尾端为终止子结构, 终止子的碱基序列会配对形成茎环结构保护 mRNA^[15]; 其余单顺反子末端仅有核酶切割留下的几个碱基, 并以 2', 3'-环磷酸根作为 3'末端, 缺乏相应的保护结构。为了增加 mRNA 的稳定性, 从而提高蛋白质表达量, 需要在非末位的蛋白质编码序列下游 3'端添加茎环序列。

此前, 已有 UCSF 的研究团队^[16]以及 2022 Fudan iGEM 团队通过设计或改变核糖体结合位点 RBS 来调控基因表达。因此, 本研究希望利用核酶辅助的多顺反子共表达系统中另一个调节因子, 通过改变蛋白编码序列 3'下游的茎环结构, 在转录后的 mRNA 稳定性水平上调节对应的蛋白质的表达。

1.3 实验假设

茎环为 RNA 内部碱基配对所形成, 其二级结构位于 mRNA 末端时, 可以防止 3'-5'核酸外切酶从 3'端对 mRNA 进行降解^[5]。因此提出实验假设, 猜测末端茎环结构与所在单顺反子 mRNA 基因表达量的关联: ①蛋白编码序列的 3'下游不存在茎环结构时, 核酸外切酶可以轻易地降解该 mRNA, 蛋白质表达量低 (如图 4.A); 蛋白编码序列 3'下游存在简单茎环结构时, 核酸外切酶较难降解 mRNA, 蛋白表达量较高 (如图 4.B); 蛋白编码序列 3'下游存在复杂茎环结构时, 核酸外切酶难以降解 mRNA, 蛋白表达量最高 (如图 4.C)。

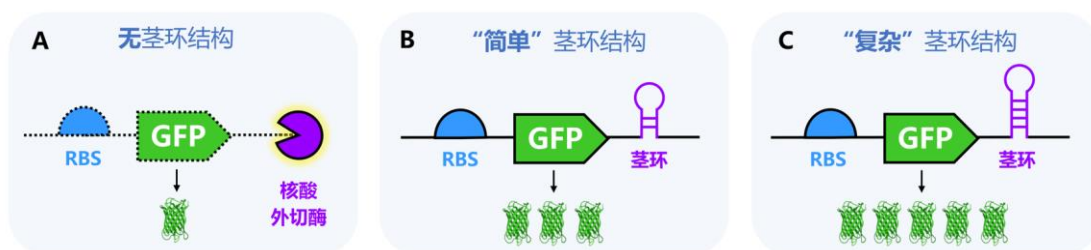


图 4. 实验假设 mRNA 末端茎环结构与所在单顺反子基因表达量的关联

(A) 蛋白编码序列的 3'下游不存在茎环结构时,核酸外切酶可以轻易地降解该 mRNA, 蛋白质表达量低; (B) 蛋白编码序列 3'下游存在简单茎环结构时, 核酸外切酶较难降解 mRNA, 蛋白表达量较高 ; (C) 蛋白编码序列 3'下游存在复杂茎环结构时, 核酸外切酶难以降解 mRNA, 蛋白表达量最高

使用定量的标准来衡量茎环二级结构的复杂性, 领域内通常基于热力学 (thermodynamic) 原理, 计算处于最佳折叠状态 RNA 序列的最低自由能 (minimum free energy change, MFE, ΔG) 来表征热力学上 RNA 的稳定性^[18]。有文献曾提出 RNA 的最低自由能 MFE 越低, 内部碱基配对越多或越强, 理论上 RNA 稳定性越高, 表达产物越多^[19]。因核酸外切酶大多从 mRNA 的 3'段开始降解, 猜测 mRNA 3'下游茎环的热稳定性可以影响所在 mRNA 基因的表达量。第一阶段实验的假设如下: 在核酶辅助的多顺反子共表达系统中, 蛋白编码序列下游的 3'茎环结构热力学稳定性越高, 即最低自由能 MFE 越低, 其所在单顺反子 mRNA 稳定性越高, 翻译出蛋白质越多。

1.4 实验设计与技术路径

基于上述假设, 设计在核酶辅助的多顺反子共表达系统中, 将蛋白编码序列下游的茎环结构作为变量, 检测其所在 mRNA 对应蛋白表达量, 以探究茎环结构对于 mRNA 稳定性的影响, 具体设计如下:

- ♦ 将绿色荧光蛋白 (Green Fluorescence Protein, GFP) 和红色荧光蛋白 (Red Fluorescence Protein, RFP) 分别作为核酶辅助的多顺反子共表达 pRAP 系统的第一和第二位蛋白编码序列, 由于位于同一个启动子下, 因此转录层面上两个基因相当;

- ♦ 改变 GFP 的 3'下游茎环序列，以影响 GFP 所在单顺反子 mRNA 的稳定性；RFP 所在的单顺反子末端存在终止子天然的茎环结构，mRNA 稳定性较高，因此将 RFP 作为蛋白表达的内参；
- ♦ 将质粒转化入大肠杆菌并表达荧光蛋白，通过比较荧光强度，可以在翻译层面探究茎环结构对 mRNA 的稳定作用。

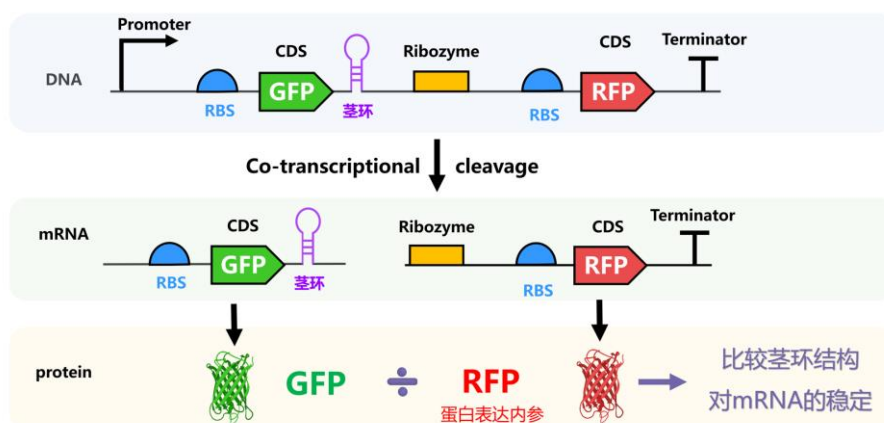


图 5. 实验设计与研究基本思路

在核酶辅助的多顺反子系统中以 GFP 和 RFP 作为第一位和第二位蛋白编码序列，核酶自剪切后形成两个单顺反子 mRNA，GFP 所在单顺反子 mRNA 稳定性受到可变茎环影响，RFP 所在单顺反子 mRNA 受终止子保护而相对稳定；因此两个荧光蛋白表达水平比较可以反映不同茎环结构对 mRNA 的保护

第一阶段的实验技术路线，如图 6：

- 1) 生成茎环序列：使用 Fudan 2023 iGEM 的陈之越开发的工具 (<https://2023.igem.wiki/fudan/software/>) 来生成具有特定最低自由能 MFE 的茎环序列；并使用 ViennaRNA 和 VARNAv3 预测茎环最低自由能与二级结构
- 2) 分子克隆制备含有不同茎环的质粒；
- 3) 质粒转化入感受态大肠杆菌 BL21 (DE3)；
- 4) 抗性平板筛选，获得单克隆；
- 5) 挑单克隆菌落于 96 孔板中培养扩增；
- 6) 使用酶标仪测定每个单克隆的 GFP 和 RFP 荧光强度；

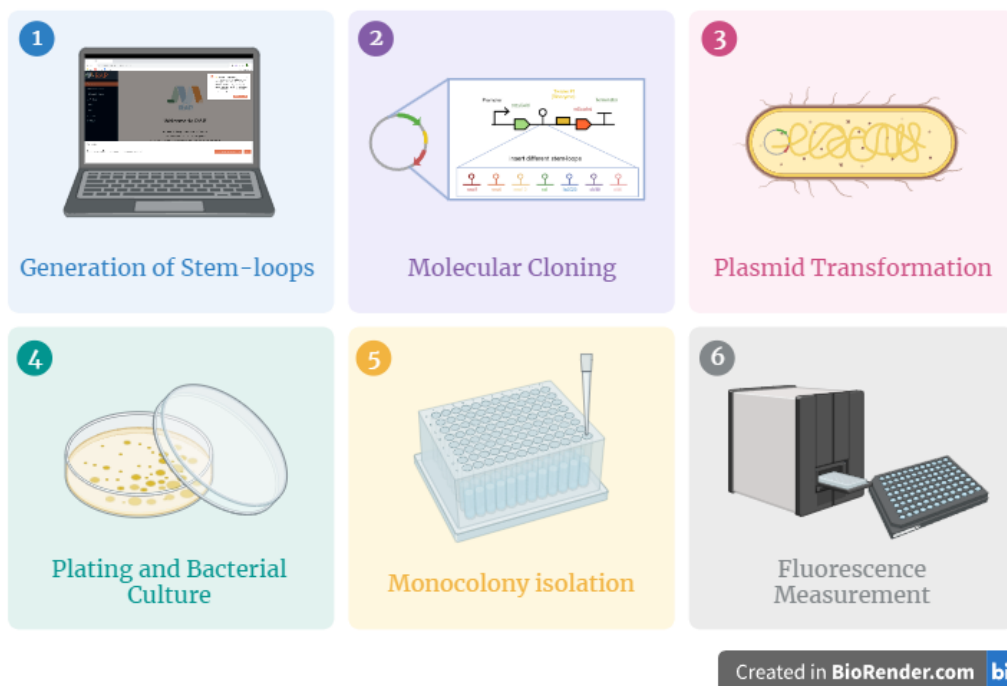


图 6. 本研究的技术路线

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 大肠杆菌菌株

DH5 α 感受态大肠杆菌用于常规分子克隆；

BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌用于蛋白质表达表达。

2.1.2 质粒载体

pOpen_v3 0718-Amp:2023 年 7 月 18 日设计并构建的以氨苄霉素 (Amp) 抗性的质粒 pOpen_v3 为骨架;表达单元的 T7 启动子和终止中间,包含 GFP 和 RFP 两个蛋白编码序列 CDS,两个 CDS 的 5'上游存在相同的核糖体结合位点, GFP5'下游紧接着一个可变的茎环结构和一个自剪切核酶 Twister P1。



图 7. 质粒载体 pOpen_v3 0718-Amp

载体为开源质粒 pOpen_v3, 氨苄霉素抗性; T7 启动子和终止子中间, 包含 GFP 和 RFP 两个荧光蛋白基因, 蛋白编码的 5' 上游存在相同的核糖体结合位点 RBS, GFP 后紧接着一个可变的茎环结构和一个自剪切核酶 Twister P1

2.1.3 引物序列

引物	序列 (5'-3')
ns1-F59-pp50	CCACCGTTTTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
ns1-R58	CATTACAAAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
new2-F59-pp53	CCGTCGGCTGCTTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC

new2-R58	AGCAGCCGACGGGGAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
new6-F59-pp52	GCTCGGCGTCCTTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
new6-R58	AGGACGCCGAGCGTCTAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
new10-F59-pp52	GGGGATCGAGGTCTTTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
new10-R58	AAAGACCTCGATCCCCCAGTAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
sl2-F59-pp50	TGCCGATCGGGTTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
sl2-R58	ACCCGATCGGCAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
sl10-F59-pp50	GCTACAGCGTCGTTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
sl10-R58	ACGACGCTGTAGCGCCGCCAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
e11t-F59-pp52	ATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAATTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
e11t-R58	GGTTTAAACGCGTAACTAGATAGAACCGCGAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
m1t-F59-pp50	CCTGAACCCAGGATAACCCTCAAAGTCGGGGGGCTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
m1t-R58	GTTATCCTGGGTTTCAGGGGGGGGGCTCCTGACCCAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
e14-F59-pp50	CGGCGCGTTAAACACACTAGAAGGCGGTTTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
e14-R58	GTTTAAACGCGCCGGGCGGTAGCGACGCGAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
stk40-F59-pp52	ACAGGGCAGGGACAGGG TTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
stk40-R58	TGTCCCTGCCCTGTCCC AAACGGTGGAAATTGTGGTGG
xrn1-F59-pp51	CGAGTTGCAAGAGAGGGAAACGCAGTCTCTTTGTAAATGCAGCCGAGGGC
xrn1-R58	CCTCTCTTGCAACTCGGATGGAGGTTACGCAAACGGTGGAAATTGTGGTGG
Open_v3-F56	GAGGTGTCAATCGTCGGAG

2.2 试剂

2.2.1 LB 培养基

成分	LB液体培养基	LB固体培养基
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Agar		15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL
1M NaOH	1 mL	1 mL
灭菌条件	121℃，高温湿热， 20 min	121℃，高温湿热， 20 min
抗生素	卡那霉素 100 µg/ml 或 氨苄霉素 100 µg/ml	卡那霉素 25 µg/ml 或 羧苄 100 µg/ml

2.2.2 SOC 培养基

成分	浓度
胰蛋白胨	2%
酵母提取物	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
葡萄糖	20 mM

2.2.3 PBS 缓冲液 (pH 7.4)

试剂	浓度	1L 1x	1L 10x
NaCl	137 mM	8 g	80 g
KCl	2.7 mM	0.2 g	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	10 mM	2.715 g	27.15 g
Na ₂ HPO ₄		1.44 g	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2 mM	0.24 g	2.4 g

2.3 实验方法

2.3.1 质粒小抽

使用 Qiagen Kit 质粒小抽试剂盒，简述步骤如下：

- 1) 取 16 h 摇菌过夜的 3 mL 菌液，13000 rpm 离心 1 min，真空泵去上层培养基；
- 2) 加入 250 μ L 储存于 4°C 的 P1 溶液，移液器吹打混匀；加入 250 μ L P2 溶液，温和地颠倒混匀 8~10 次，溶液变澄清粘稠；马上加入 350 μ L P3 溶液，温和颠倒混匀，溶液出现白色絮状物质；
- 3) 4°C 低温 13000 rpm 离心 10 min，将上清转移到吸附柱内（下接收集管），离心 13000 rpm 离心 1 min，真空泵抽去废液；

- 4) 用 600 μL PW 溶液清洗后离心，重复清洗过程 2 次，空离并静置挥发乙醇 20 min；
- 5) 将吸附柱放在无菌离心管上，加入已 70°C 预热的 50 μL TE 溶液，静置 2 min，洗脱并离心 1 min，重复洗脱 2 次。

2.3.2 酶切

用于 pRAP 无缝克隆的片段，由 SmaI 酶切后得到载体，由 PmeI 酶切后得到插入片段。

- 1) 于冰上配制以上总体系 20 μL 的反应体系：

总酶切体系	20 μL
酶 (SmaI/PmeI)	0.5 μL
质粒	0.5 μg 换算
NEB Buffer (Cut Smart/3.1)	按照倍数
ddH ₂ O	补齐

- 2) SmaI 25°C 室温酶切过夜 16 h，PmeI 37°C 金属浴酶切过夜 16 h；
- 3) 酶切结束，体系加入 4 μL 6x DNA loading buffer，跑 1% 琼脂糖凝胶。

2.3.3 胶回收

用于 pRAP 无缝克隆的片段，来自胶回收的酶切产物：

- 1) DNA 电泳结束后，在紫外灯下切下含有目的 DNA 片段的凝胶，将凝胶置于无菌离心管；
- 2) 在离心管中加入 200 μL 的 DE-A 溶液，70°C 金属浴 7-10 min，确保凝胶块完全溶解；
- 3) 溶胶后加入 100 μL 的 DE-B 溶液，溶液从红色变为透明几乎无色；
- 4) 将吸附柱置于收集管中，将溶液转移至吸附柱中，13000 rpm 离心 1 min，弃溶液；
- 5) 加入 600 μL Buffer GW 溶液，13000 rpm 离心 1 min，弃溶液；
- 6) 空离 13000 rpm 离心 2 min，弃收集管；

- 7) 将吸附柱放在无菌离心管上，静置挥发乙醇 20 min，加入已 70°C 预热的 10 μ L TE 溶液，静置 2 min，洗脱并离心 1 分钟，重复洗脱 1 次。

2.3.4 ClonExpress 无缝克隆连接

使用 pRAP 系统时，采用 ClonExpress 试剂盒 (Vazyme) 进行分子克隆片段连接：

- 1) 于冰上配制以下总体积 2 μ L 的反应体系：

组分	体积 (μ L)
SwaI 酶切后线性化载体	0.5
PmeI 酶切后插入片段	0.5
5 x CE II Buffer	0.4
Exnase II	0.2
ddH ₂ O	0.4

- 2) 使用移液器轻轻吸打混匀 (请勿振荡混匀)，短暂离心将反应液收集至管底；
- 3) PCR 仪上 37°C 反应 30 min；结束后降至 4°C 或立即置于冰上冷却。

2.3.5 重组产物转化

- 1) 在冰上解冻感受态细菌；
- 2) 将 2 μ L 重组产物全部加入 33 μ L 感受态细菌中，轻轻混匀 (请勿振荡混匀)，冰上静置 30 min (此时不要震荡细菌)；
- 3) 42°C 水浴热激 45 sec 后，立即置于冰上冷却 2-3 min (请勿震荡细菌)。
- 4) 加入 500 μ L SOC (不添加抗生素)，37°C 培养箱放置 1 h ；
- 5) 将相应抗性的 LB 固体培养基平板在 37°C 培养箱中预热；
- 6) 用无菌涂布棒在含有抗性的平板上涂 200 μ L 的 SOC 菌液，剩余菌液保存于冰箱；
- 7) 37°C 培养箱中倒置培养平板 16 h 至单菌落可见。

2.3.6 点突变 PCR

通过点突变 PCR 更改质粒载体中的茎环结构，步骤如下：

- 1) 设计点突变 PCR 引物^[20];
- 2) 于冰上配置以下总体积 25 μ L 的 Phanta PCR 反应体系:

组分	体积 (μ L)
模板 DNA	1-5 ng
F-primer	1
R-primer	1
dNTP	0.5
Phanta DNA polymerase (Vazyme)	0.2
2x Phanta Buffer	12.5
ddH ₂ O	补齐

- 3) PCR 程序:

步骤	温度 ($^{\circ}$ C)	时间 (min)	循环数
Denature	95	5	1
Amplification	95	1	12
	Tm no -5	1	12
	72	15	12
Annealing	Tm pp-5	1	1
Extension	72	30	1
Hold	16	60	99

- 4) PCR 反应后，25 μ L 体系，10 μ L 跑 1%琼脂糖凝胶电泳检测产物，15 μ L 加入 0.5 μ L DpnI 酶切 37 $^{\circ}$ C 16 h，后取 2 μ L 用于细菌转化。

2.3.7 鉴定重组或点突变所得菌落

- 1) 挑平板上单克隆菌落，在 2 mL 相应抗性的 LB 液体培养基中摇菌 3 h；
- 2) 鉴定重组/点突变是否成功，于冰上配制以下总体积 25 μL 的 Taq PCR 反应体系：

组分	体积 (μL)
模板 DNA (LB 菌液)	3
Forward-primer	0.5
Reverse-primer	0.5
dNTP	0.5
Taq 酶	0.2
10 x Taq Buffer	2.5
ddH ₂ O	17.8

- 3) PCR 结束，体系加入 5 μL 6x DNA loading buffer，跑 1%琼脂糖凝胶。

2.3.8 酶标仪测量大肠杆菌 GFP/RFP 荧光强度

- 1) 细菌培养：用排枪在 96 深孔板中每孔中加入 500 μL 相应抗性的液体 LB 培养基；质粒转化和涂板 12 h 后，用灼烧灭菌的镊子夹 10 μL 白色枪头挑单克隆放入 96 孔板孔中，37°C摇床培养 24 h 至 OD600 约等于 1.3；
- 2) 样品准备：将 96 深孔板中每个孔中 33 μL 的大肠杆菌悬浊液转移至光学透光的 96 孔板，并用 67 μL 的 PBS 缓冲液稀释至 OD600 约等于 0.4；
- 3) 荧光测量：振板 10 sec，用 Biotek 酶标仪测量 96 孔板中每一孔的 GFP 与 RFP 荧光 (增益 50；吸收光：600 nm；荧光：激发波 485、540 nm；发射波 528、620 nm)；

2.4 实验软件

Microsoft Excel 用于导出且初步处理酶标仪数据, GraphPad Prism 8.0.2 用于可视化与分析 (线性回归、One-way ANOVA) 酶标仪测定的实验结果。

Snapgene 6.0.2 用于 DNA 序列编辑与分析。

三、研究结果

3.1 分子克隆

文献中为促进 pRAP 系统的分子克隆^[4]，在启动子下，第一个蛋白编码序列上游有茎环结构、核酶序列 (如图 1)。为了减小核酶自剪切后留下的 5' 茎环对于蛋白翻译起始的影响，我们直接将第一个蛋白编码序列 GFP 放置于启动子下游，且更换了原先 pRAP 系统的载体骨架，采用了开源的 Open_v3 0718 质粒。

为构建最简化的核酶辅助的多顺反子表达质粒，我们在表达单元的启动子和终止子之间，仅放入两个蛋白编码序列，分别为亮度高、稳定性高的绿色荧光蛋白 stayGold^[21] (为了简化起见，文中统一称为 GFP) 和明亮的单体红色荧光蛋白 mScarlet^[22] (为了简化起见，文中统一称为 RFP)，两者中间插入高效率的自剪切核酶 Twister P1^{[4] [11]}。在转录的同时，包含 GFP 和 RFP 的多顺反子 mRNA 会在核酶的 5' 端进行自我剪切，分离为 2 个分别含有 GFP 和 RFP 的单顺反子 mRNA，单顺反子的 5' 上游存在相同的核糖体结合位点，可以高效起始翻译；RFP 的下游 3' 端存在终止子的天然茎环结构保护该单顺反子，GFP 的下游 3' 端存在可变的茎环结构，稳定所在的单顺反子 mRNA。

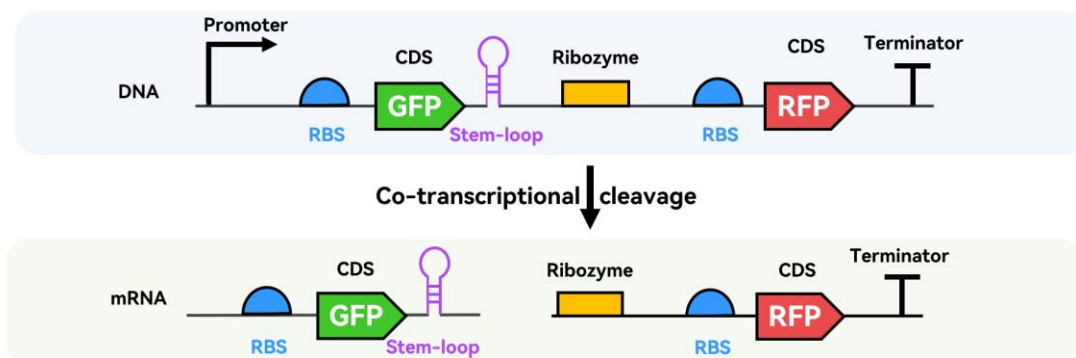


图 8. 表达单元

T7 启动子和终止子构成的表达单元中，有 GFP 和 RFP 两个蛋白编码序列，在两者中间插入茎环结构 (变量) 与核酶 Twister P1

3.1.1 茎环结构设计

本研究基于单顺反子 3' 端茎环结构对 mRNA 的稳定作用与 RNA 最低自由能的定义，提出假设：在核酶辅助的多顺反子系统中，非末位蛋白编码序列下游的 3' 茎环结构热动力学稳定性越高 (即最低自由能 MFE 越低)，其所在单顺反子

mRNA 稳定性越高，翻译出的蛋白质越多。

根据假设设计最低自由能不同的一系列茎环，每一个茎环由三部分组成：①共同的间隔 spacer 序列 (27 bp)：分隔开蛋白编码序列和茎环主体，减小茎环结构对核糖体翻译至终止密码子的空间位阻影响^[23]；②不同的 insert 序列；③共同的 ending 序列 (5 bp)：分隔开茎环主体与核酶，减少茎环结构对于下游核酶自剪切效率的影响。

实验使用的茎环分为以下几大类：

- Nsl (No stem-loop)：阴性对照组，序列不形成茎环结构，仅包含 spacer 与 ending 序列，不包含 insert 序列；
- DG2.9、DG3.6、DG6.0、DG9.4、DG10.6：具有不同最低自由能的实验组，序列设计采用陈之越开发软件 (<https://2023.igem.wiki/fudan/software/>)，输入特定的最低自由能，软件输出具有相应最低自由能的茎环序列；命名中 DG (ΔG) 为最低自由能符号，数字表示最低自由能 (负数) 的绝对值；
- DG3.6-6.0、DG6.0-3.6：串联茎环的实验组，将 DG3.6 与 DG6.0 茎环按照先后顺序串联；
- Liu2023：含有茎环的阳性对照组，序列来源于核酶辅助的多顺反子共表达系统^[4]，用于稳定单顺反子 mRNA 的 3'端茎环序列；
- Evopreq1-1 trimmed (e11t)、mpkot-1 trimmed (mpk1)、evopreq1-4 (e14)、stk40、xrn1：RNA 序列形成假结 (pseudoknot) 的实验组，序列来源于 David Liu 课题组文献^[24]，在先导编辑 (prime editing) 中将假结序列放置于 pegRNA (prime editing guide RNA) 末端，起到稳定作用。^[24]

表 1. 茎环 RNA 序列与最低自由能 MFE 预测

Name	MFE (kcal/mol)	Spacer	Insert	Ending
Nsl	0.00		/	UUUGU
DG2.9	-2.90	AAACACC	gccgaucgggu	
DG3.6	-3.60	CACCACA	ccccgucggcugcu	
DG6.0	-6.00	AUUUCCA	agacgcucggcguccu	
DG3.6-6.0	-8.10	CCGUUU	ccccgucggcugcuCCACCGUUUaga	

		cgucucggcguccu
DG6.0-3.6	-8.10	agacgcucggcguccuCCACCGUUUc
		cccgucggcugcu
DG9.4	-9.40	acugggggggaucgaggucuuu
DG10.6	-10.60	ggcggcgcuacagcgucgu
Liu2023	-16.40	cccgacgcuucggcgucggg
evopreq	-9.50	cgcgguucuaucuauguuacgcguuua
1-1trimmed		accaacuagaa
mpkot-1	-25.70	gggucaggagccccccccugaaccc
trimmed		aggauaaccuccuaaagucggggggc
evopreq	-16.20	cgcgucgcuaccgcccggcgguuaa
1-4		acacacuagaaggcgguu
stk40	-8.30	gggacagggcagggacaggg
xrn1	-10.50	gcguaaccuccauccgaguugcaaga
		gagggaaacgcagucuc

表注：MFE 表示使用 ViennaRNA 中的 RNAfold WebServer 计算预测出的 RNA 序列最低自由能；RNA sequence 中绿色大写碱基表示共有 spacer 分隔序列 (减小茎环结构对核糖体翻译至终止密码子的空间位阻影响)，黑色小写碱基表示茎环特有 insert 序列 (实验变量)，蓝色大写碱基表示共有 ending 序列 (减少茎环结构对核酶自剪切的影响)。

使用 ViennaRNA 中的 RNAfold WebServer, 除了预测出的茎环序列最低自由能，还可以预测出表示二级结构的 dot-bracket notation，将序列与对应的 dot-bracket notation 输入至 VARNAv3 软件，可以生成茎环二级结构 (如图 9)。茎环的最低自由能越低，RNA 茎环内部碱基配对更多或更强，符合茎环二级结构的预期。

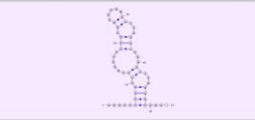
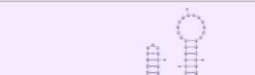
A 茎环二级结构图	名称	最低自由能 (kcal/mol)	B 二级结构图	名称	最低自由能 (kcal/mol)
	Nsl	0.0		DG3.6-6.0	-8.1
	DG2.9	-2.9		DG6.0-3.6	-8.1
	DG3.6	-3.6		stk40	-8.3
	DG6.0	-6.0		e11t	-9.5
	DG9.4	-9.4		xrn1	-10.5
	DG10.6	-10.6		e14	-16.2
	Liu2023	-16.4			

图 9. 茎环二级结构预测

在 ViennaRNA 的 RNAfold WebServer 中输入 RNA 茎环序列，预测二级结构并获得 dot-bracket notation，将碱基序列与对应的 dot-bracket notation 输入至 VARNAv3 软件，生成茎环二级结构图；每个茎环由三部分组成，绿色的 spacer 间隔序列 (大写字母, 27 bp)、insert 序列 (小写字母) 与蓝色的 ending 末端序列 (大写字母, 5 bp)；每一个圆圈表示一个碱基，蓝色双线表示 UG 碱基配对，蓝色单线表示 AU 碱基配对，蓝色点表示非经典碱基配对；(A) 表格包含具有不同最低自由能的茎环结构；(B) 表格包含串联茎环结构 (土黄色底) 与假结结构 (紫色底)

3.1.2 质粒构建

基于含茎环 Liu2023 的 GFP/RFP 表达单元的 pOpen_v3 0718 质粒，采用点突变 PCR 技术构建含有不同茎环结构的质粒^[20]。点突变 PCR 结束后，10 μ L 产物跑 1% 琼脂糖凝胶电泳初步检验点突变 PCR 是否成功，若能看到大小正确的明显条带则点突变 PCR 成功，若无法看到条带则点突变 PCR 失败 (如图 10)。

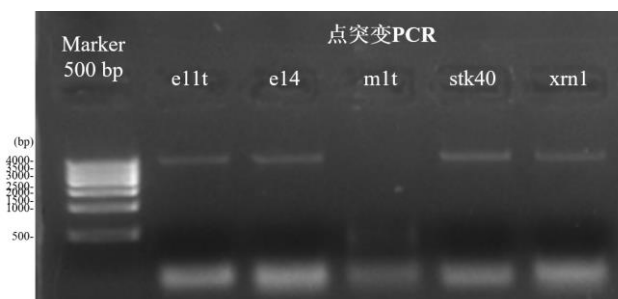


图 10. 点突变 PCR 后琼脂糖凝胶电泳检测结果

泳道 1: 500 bp DNA Ladder; 泳道 2: e11t 点突变 PCR 成功; 泳道 3: e14 点突变 PCR 成功; 泳道 4: m1t 点突变 PCR 失败; 泳道 5: stk40 点突变 PCR 成功; 泳道 6: xrn1 点突变 PCR 成功; 点突变 PCR 产物的质粒大小约 3.6 kb

点突变 PCR 结束后，取 15 μ L 产物加入 DpnI 酶过夜消化质粒模板 DNA，后取 2 μ L 直接转化入感受态 DH5 α 大肠杆菌中，转化涂板 18 h 后，挑取单克隆菌落于对应抗性 (Amp) 的液体培养基中摇菌 3 小时，使用 Taq DNA 聚合酶检测单克隆菌落是否是突变成功的质粒，琼脂糖凝胶电泳结果 (如图 11)：

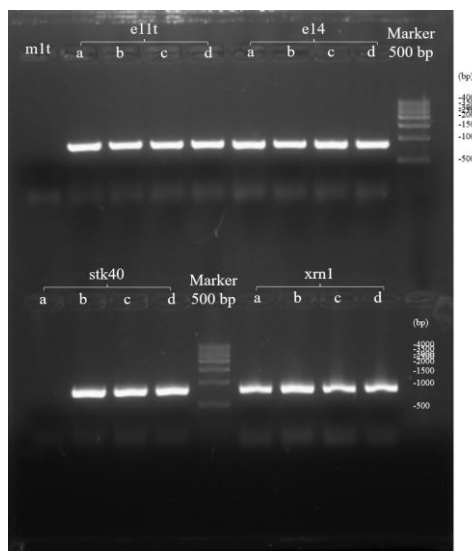


图 11. Taq PCR 并琼脂糖凝胶电泳检测点突变所得单菌落结果

Taq PCR 正向引物均使用 Open_v3-F56

第一排：泳道 1：m1t 点突变 PCR 失败；泳道 2-5：反向引物 e11t-R58，4 个单克隆菌落 Taq PCR 成功；泳道 6-9：反向引物 e14t-R58，e14t 中 4 个单克隆 Taq PCR 成功；泳道 10：500 bp DNA Ladder；

第二排：泳道 1-4：反向引物 stk40-R58，stk40 中 3 个单克隆 Taq PCR 成功；泳道 5：500 bp DNA Ladder；泳道 6-9：反向引物 xrn1-R58，xrn1 中 4 个单克隆 Taq PCR 成功；

将 Taq PCR 成功的单克隆菌液送测序，对比测序结果与目标质粒，判断质粒是否构建成功 (测序对比示意如图 12)：

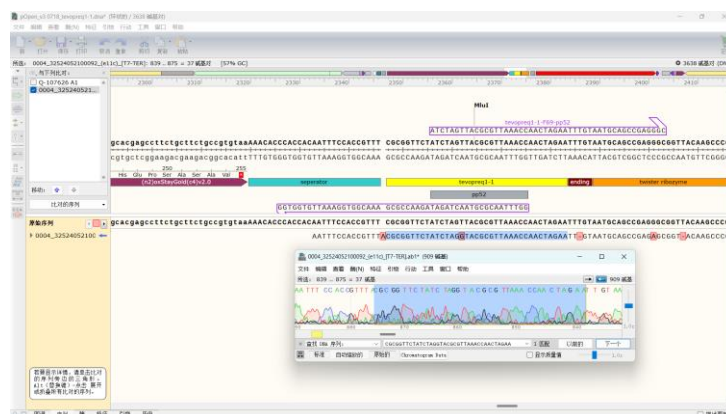


图 12. 测序结果与目标质粒对比

使用 Snapgene 软件比对 e11t 克隆 c 测序结果与目标质粒，测序结果正确

3.2 基因表达量与所在 mRNA 的 3' 茎环最低自由能无关

质粒经测序确认后，转化入 BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌中表达蛋白，抗性平板上生长 18 h，挑单克隆于 96 孔板中，抗性液体培养基中培养 24 h，稀释于光学透光底面黑框 96 孔板，上酶标仪测定单位浓度的大肠杆菌荧光强度。

为了验证假设“蛋白编码序列下游的 3' 茎环结构最低自由能 MFE 越低，其所在单顺反子 mRNA 稳定性越高，翻译出的蛋白质越多”正确与否，第一批实验使用含有茎环 Nsl、DG2.9、DG3.6、DG6.0、DG9.4、DG10.6、Liu2023 (如图 13) 的质粒进行实验。

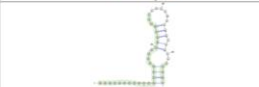
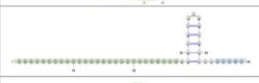
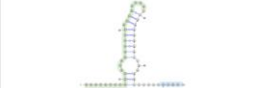
茎环二级结构图	名称	最低自由能 (kcal/mol)
	Nsl	0.0
	DG2.9	-2.9
	DG3.6	-3.6
	DG6.0	-6.0
	DG9.4	-9.4
	DG10.6	-10.6
	Liu2023	-16.4

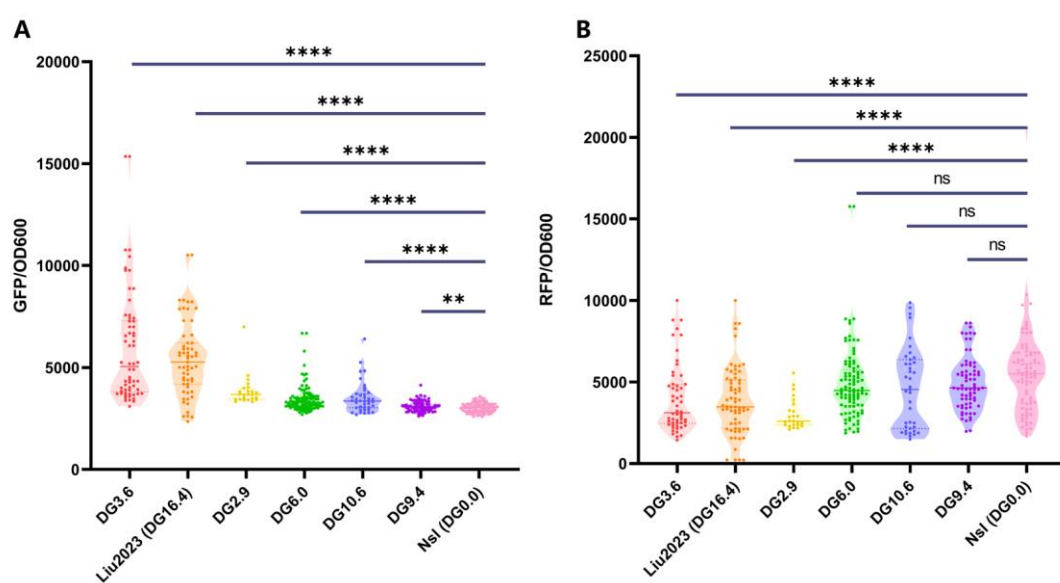
图 13. 最低自由能 (MFE) 不同的茎环二级结构

具有不同最低自由能的实验组茎环 Nsl、DG2.9、DG3.6、DG6.0、DG9.4、DG10.6、DG16.4 二级结构与最低自由能；名称中 DG (ΔG) 为最低自由能符号，数字表示最低自由能的绝对值；用于判定单顺反子 mRNA 的 3' 下游茎环最低自由能与其所在 mRNA 稳定性的关系

使用 Microsoft Excel 与 GraphPad Prism 对酶标仪输出的数据进行处理，以吸光度 OD600 作为分母，GFP 或 RFP 荧光强度作为分子，计算 96 孔板中每个孔 (单克隆) 大肠杆菌的单位浓度荧光强度 GFP/OD600 与 RFP/OD600，以平衡细菌浓度不同导致的荧光强度差异。

如图 14，将 GFP/OD600 与 RFP/OD600 作为指标，比较不同实验组之间的单位浓度荧光强度差异。使用 One-way ANOVA 非参数检验分析每一个实验组与 Nsl 阴性对照组的单位荧光强度。图 14.A 显示各实验组与 Nsl 的 GFP/OD600 都

存在显著差异，说明不同的茎环结构稳定 mRNA 的效果存在差异，因此绿色荧光蛋白量不同。RFP 所在单顺反子 mRNA 受到终止子结构的保护，而与 GFP 的 3'下游茎环无关。观察到，不同茎环实验组间 RFP/OD600 存在差异 (如图 14. B)，尤其是部分实验组 (DG3.6、Liu2023、DG2.9) 与 Nsl 对照组的 RFP/OD600 存在显著差异。猜测这可能是由于 DG3.6、Liu2023、DG2.9 三个实验组的 GFP 所在 mRNA 较稳定，占据了较多的核糖体用于翻译 GFP，体现为 GFP/OD600 值更高 (如图 14.A)；而用于翻译 RFP 的 mRNA 的核糖体处于不饱和状态，因此 RFP/OD600 相比于 Nsl 对照组偏低，且存在显著差异。



14. 单位浓度大肠杆菌的 GFP 与 RFP 荧光强度比较图

- (A) 分别以 GFP/OD600 和 (B) RFP/OD600 作为纵坐标，建立不同实验组内单位大肠杆菌荧光强度的小提琴图，每个点表示一个大肠杆菌单克隆菌落，不同颜色表示表达 GFP 下游具有不同茎环结构的实验组别；使用 Graphpad Prism 的 One-way ANOVA (非参数检验) 分析实验组与阴性对照组 nsl 的单位荧光强度差异是否具有显著性；****表示 P 值<0.0001，**表示 P 值<0.01，ns 表示不显著

接下来以 RFP/OD600 为 x 轴，GFP/OD600 为 y 轴建立散点图，每个点表示一个大肠杆菌单克隆菌落。本实验中，GFP 和 RFP 在同一个启动子下起始转录，经过高效核酶剪切，生成的单顺反子 mRNA 量大致相当；蛋白编码序列 5'上游具有相同的核糖体结合位点，翻译起始强度大致相当；同一个实验组内茎环结构稳定 mRNA 效果大致相当，因此组内 GFP/OD600 与 RFP/OD600 的单位浓度荧

光蛋白表达量呈现一个线性关系，使用线性回归拟合各实验组的 GFP/OD600 与 RFP/OD600 线性方程式。

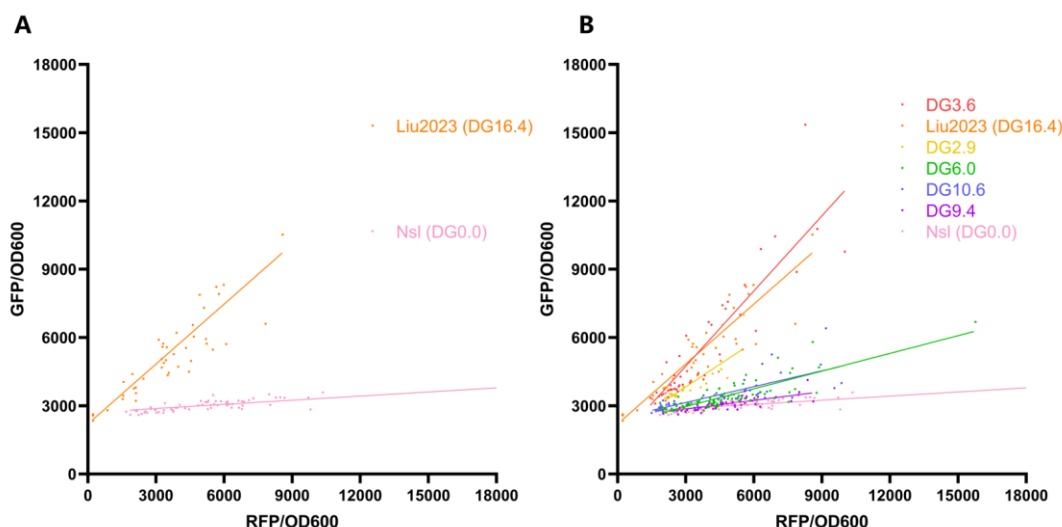


图 15. 单位浓度大肠杆菌的 GFP 与 RFP 荧光强度分布图

以 RFP/OD600 为 x 轴，GFP/OD600 为 y 轴建立散点图，每个点表示一个大肠杆菌单克隆菌落单克隆，不同颜色表示表达 GFP 下游具有不同茎环结构的实验组别；

使用 Graphpad Prism 对单位浓度的两种荧光强度进行线性回归分析，计算出线性方程式 (DG3.6: $Y = 1.10 \cdot X + 1436$, $R^2 = 0.7832$; Liu2023: $Y = 0.88 \cdot X + 2200$, $R^2 = 0.8161$;

DG2.9: $Y = 0.66 \cdot X + 1851$, $R^2 = 0.6861$; DG6.0: $Y = 0.26 \cdot X + 2187$, $R^2 = 0.7400$;

DG10.6: $Y = 0.23 \cdot X + 2446$, $R^2 = 0.5702$; DG9.4: $Y = 0.13 \cdot X + 2473$; $R^2 = 0.6016$;

Nsl: $Y = 0.06 \cdot X + 2698$, $R^2 = 0.4644$)

如图 15.A，相比于无茎环结构的 Nsl 对照组，茎环 Liu2023 实验组 GFP 表达量更多，体现为 GFP/OD600 和 RFP/OD600 的线性方程斜率更高，说明茎环结构可以起到稳定 mRNA 的作用，从而增加 GFP 的表达量。

然而如图 15.B，可以观察到茎环序列最低自由能 MFE 与大肠杆菌的 GFP/OD600 和 RFP/OD600 线性方程斜率 (代表 GFP 所在的 mRNA 相对稳定性) 不存在明显关联，例如 DG3.6 的茎环内部碱基配对少，最低自由能较高，但是 GFP 所在 mRNA 稳定，体现为斜率高。实验结果说明“蛋白编码序列下游的 3' 的茎环结构最低自由能 MFE 越低，所在单顺反子 mRNA 稳定性越高”的假设不成立。

猜想假设不成立的原因可能是由于细胞内影响 mRNA 稳定性的因素较多，包括小调节 RNA (small regulatory RNA, sRNA)、结合特定 RNA 序列的蛋白等的存在，都会影响 mRNA 的降解^[25]，且有文献发现具有特定的长度和结构而非热

动力学上稳定性的 mRNA 茎环结构影响核糖体翻译^[26]，后续将从 mRNA 的 3' 非翻译区域的长度和结构探讨对 mRNA 稳定性的影响。

3.3 串联茎环结构无法叠加 mRNA 稳定性

第一批实验结果显示蛋白编码序列 CDS 下游的 3' 的单个茎环结构最低自由能 MFE 与转录剪切后单顺反子 mRNA 稳定性无明显关联。接着提出第二个假设有关茎环长度是否是影响 mRNA 稳定性的因素：串联茎环可以通过叠加的形式增加 mRNA 稳定性。

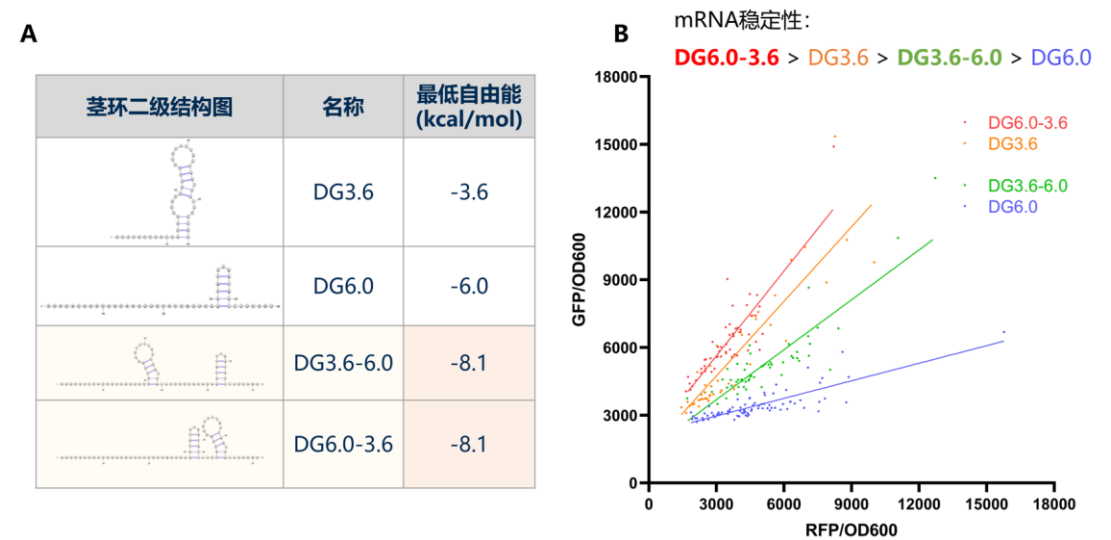


图 16. 单个/串联茎环结构图与大肠杆菌荧光强度分布图
(A) 单个 (DG3.6/DG6.0) 与串联 (DG3.6-6.0/DG6.0-3.6) 茎环的最低自由能与二级结构图; (B) 以 RFP/OD600 为 x 轴, GFP/OD600 为 y 轴建立散点图, 每个点表示一个大肠杆菌单克隆菌落单克隆, 不同颜色表示表达 GFP 下游具有不同茎环结构的实验组别; 使用 Graphpad Prism 对单位浓度的两种荧光强度进行线性回归分析, 计算出线性方程式 (DG6.0-3.6: $Y = 1.25 \cdot X + 1875$, $R^2 = 0.7315$; DG3.6: $Y = 1.10 \cdot X + 1436$, $R^2 = 0.7832$; DG3.6-6.0: $Y = 0.74 \cdot X + 1478$, $R^2 = 0.7682$; DG6.0: $Y = 0.26 \cdot X + 2187$, $R^2 = 0.7400$), mRNA 稳定性 $DG6.0-3.6 > DG3.6 > DG3.6-6.0 > DG6.0$

将 DG3.6 与 DG6.0 茎环的 insert 部分串联, 中间插入 linker 序列 CCACCGUUU, 以 DG3.6-6.0 和 DG6.0-3.6 的顺序串联 (如图 16.A), 重新预测串联茎环 DG3.6-6.0 和 DG6.0-3.6 的最低自由能, ΔG 都为 -8.1 kcal/mol。

如图 16.B, 实验结果显示, 即使按照不同顺序串联的茎环最低自由能 MFE 相等, 但是实验组 DG3.6-6.0 和 DG6.0-3.6 的 GFP 所在 mRNA 稳定性不同, 再次证明了茎环最低自由能与 mRNA 稳定性无关。

比较单个与串联茎环的 GFP 所在 mRNA 稳定性: $DG6.0-3.6 > DG3.6 > DG3.6-6.0 > DG6.0$ 。说明串联茎环无法通过仅叠加或中和 mRNA 稳定性, 再次推翻了“串联茎环可以通过叠加的形式增加 mRNA 稳定性”的假设, 串联后茎环的稳定 mRNA 作用与具体的 3' 末端具体的碱基序列有关。

3.4 复杂的假结结构不一定能稳定 mRNA

前两部分实验分别推翻了茎环结构的热稳定性、长度与 mRNA 稳定性的正相关性, 下一部分实验研究其他特殊的 RNA 结构置于蛋白编码序列的 3' 下游是否可以稳定所在 mRNA。开发先导基因编辑的 David Liu 课题组为了防止 pegRNA 被降解, 在其 3' 末端添加了假结结构 (RNA 内至少包含两个茎环结构, 且茎环之间存在重叠部分的三维折叠结构), 并证实了添加假结的 pegRNA 稳定性更高, 基因编辑效率更高^[24]。

因此, 我们希望研究相较于茎环结构更加复杂的假结结构是否可以稳定 mRNA。我从文献^[24]中筛选出 5 个与前部分茎环结构最低自由能 MFE 近似的假结序列 (evopreq1-1 trimmed 缩写为 e11t、mpkot-1 trimmed 缩写为 mpk1、evopreq1-4 缩写为 e14、stk40、xrn1), 观察其稳定 mRNA 的效果。实验假设: 假结相比于茎环具有更加复杂的结构, 因此稳定 mRNA 的效果更好。

假结结构中 mpk1 结构最为复杂, 制备质粒失败, 因此只展示剩余 4 组实验数据。如图 17, 实验结果显示使用的假结结构相比无茎环 Nsl 对照组, 一定程度上可以起到稳定 mRNA 的作用, 但是其效果均不如茎环 Liu2023。推测假结结构可以稳定 pegRNA 却无法稳定 mRNA 的原因, 是 pegRNA 长度较短 (~150 bp), 而较长的 GFP/RFP mRNA (~700 bp) 削弱了假结结构的保护作用。

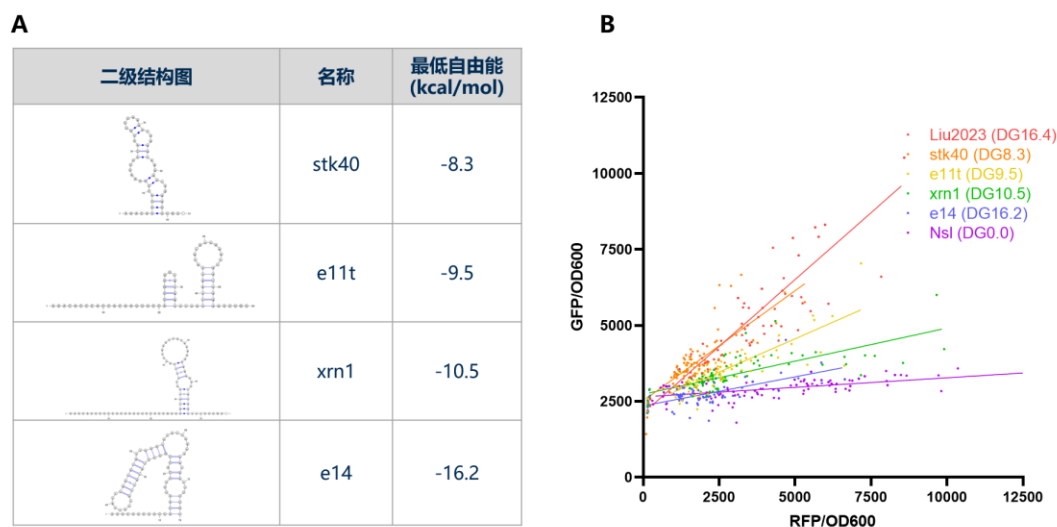


图 17. 假结二级结构图与大肠杆菌荧光强度分布图

(A) 假结结构 (stk40、e11t、xrn1、e14) 的最低自由能与二级结构图；
 (B) 以 RFP/OD600 为 x 轴，GFP/OD600 为 y 轴建立散点图，每个点表示一个大肠杆菌单克隆菌落单克隆，不同颜色表示表达 GFP 下游具有不同茎环结构的实验组别；
 使用 Graphpad Prism 对单位浓度的两种荧光强度进行线性回归分析，计算出线性方程式
 (Liu2023: $Y = 0.88 \cdot X + 2114$, $R^2 = 0.7992$; stk40: $Y = 0.72 \cdot X + 2523$, $R^2 = 0.6124$;
 e11t: $Y = 0.44 \cdot X + 2371$, $R^2 = 0.6371$; xrn1: $Y = 0.22 \cdot X + 2737$, $R^2 = 0.5491$;
 e14: $Y = 0.19 \cdot X + 2254$, $R^2 = 0.4474$; Nsl: $Y = 0.06 \cdot X + 2648$, $R^2 = 0.3491$)

3.5 改变茎环结构调节 β -胡萝卜素合成途径

上述的 3 个实验虽然推翻假设，排除了基因表达量与所在 mRNA 的 3' 茎环结构热稳定性、长度与假结结构的关联，但基于以上实验结果，仍可以使用经过 GFP/RFP 实验检验的不同茎环调节 mRNA 稳定性，用于精确调节基因表达。

最后的实验部分，想尝试将茎环用于实际场景，调节代谢通路中多个蛋白的表达量，避免中间产物堆积，缓解细胞代谢压力并提高最终产物产量。去年，所在的实验室在大肠杆菌中过表达相关代谢通路的四个酶 (crtE、crtB、crtI 和 crtY)^[27]，用于生产 β -胡萝卜素。

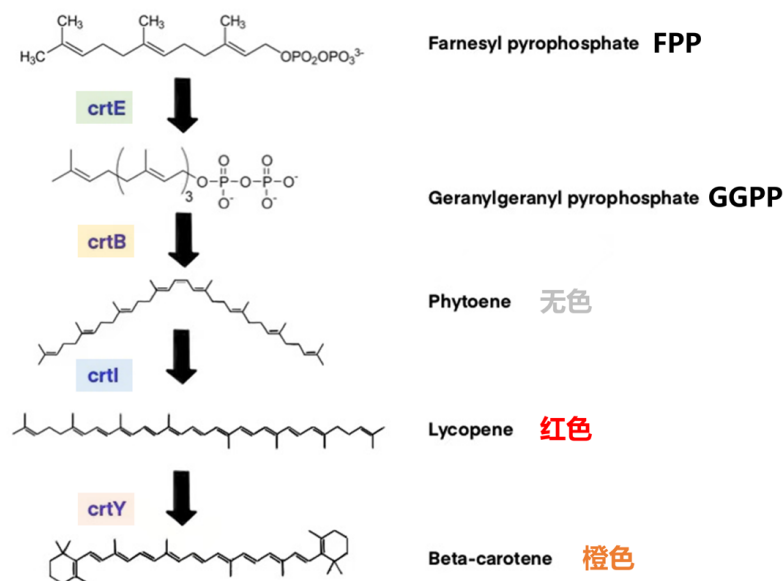


图 18. 代谢工程中大肠杆菌内 β -胡萝卜素合成途径 (图片来源于 <https://static.igem.wiki/teams/4162/wiki/carotene-synthesis.png>)

以大肠杆菌体内含有的二磷酸法呢醇酯为底物, 通过 crtE、crtB、crtI、crtY 四个酶依次催化可以形成 β 胡萝卜素; FPP: 二磷酸法呢醇酯; GGPP: 香叶基二磷酸甘草酯; Phytoene: 植物烯 (无色); Lycopene: 番茄红素 (红色); Beta-carotene: β -胡萝卜素 (橙色)

已知的 β -胡萝卜素合成通路以大肠杆菌体内含有的二磷酸法呢醇酯 (Farnesyl pyrophosphate, FPP) 为底物, 通过 crtE、crtB、crtI、crtY 四个酶依次催化形成 β -胡萝卜素^[27]。如图 19, 去年实验室在核酶辅助的多顺反子表达系统中, 利用不同强度的核糖体结合位点 (RBS) 调节代谢通路酶水平, 1722 质粒中四个酶上游的核糖体结合位点强度相同, 菌落呈现米色; 1748 质粒中使用较弱的核糖体结合位点下调了代谢通路中最后一个酶 crtY, 菌落呈现橙黄色; 1750 质粒中使用较强的核糖体结合位点上调了代谢通路中第一个酶 crtE, 菌落呈现橙黄色。从菌落的颜色就可以判断 1748、1750 大肠杆菌相较于 1722 生产 β -胡萝卜素的量更多; 这是由于通过改变代谢通路酶的起始翻译速率, 将用于翻译的能量和物质更多地分配到上游, 可以避免由于限速步骤而导致代谢产物堆积, 减少需求量较小的下游酶的合成。

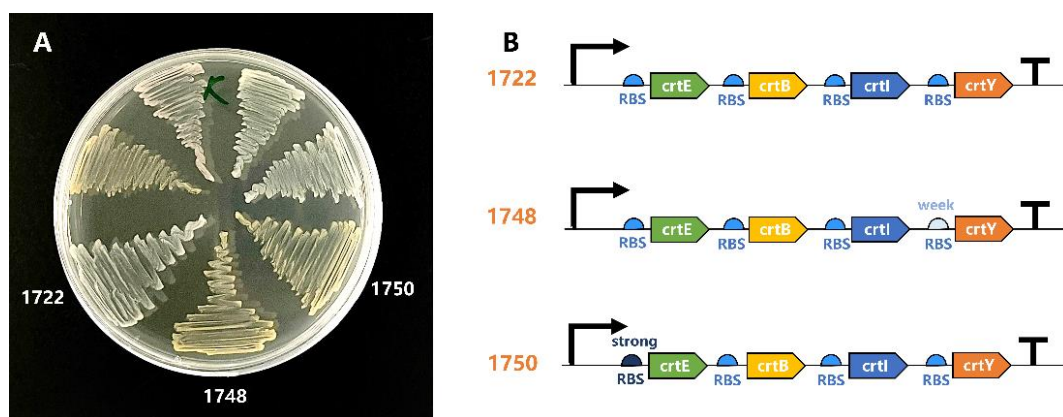


图 19. 改变核糖体结合位点调节 β -胡萝卜素合成途径增加产量 (质粒来源于 Fudan 2022 iGEM)

(A) 表达 1722、1748、1750 质粒，合成 β -胡萝卜素的大肠杆菌划线菌苔，分别呈现米色、橙黄色、橙黄色；(B) 核酶辅助的多顺反子共表达系统中表达 β -胡萝卜素合成途径的四个酶 crtE/B/I/Y，四个蛋白编码序列之间插入自剪切核酶 Twister P1 (图中省略)，每一个单顺反子 3'下游由相同的 Liu2023 茎环稳定 mRNA (图中省略)，改变单顺反子 5'上游核糖体结合位点 (1722: 采用四个相同强度的 RBS；1748: 合成途径最下游酶 crtY 由弱 RBS 调控；1750: 合成途径最上游酶 crtE 由强 RBS 调控)

基于前部分对茎环的初步研究，本实验希望仅仅调整 3'茎环来调节 β -胡萝卜素的代谢通路，看其是否具有与核糖体结合位点类似的调控多顺反子各基因相对表达量的效果。采用 SwaI/PmeI 酶切连接的 pRAP 分子克隆策略，在一个多顺反子共表达质粒中先后连接 4 个代谢通路中的酶 (crtE、crtB、crtY、crtI)，四个酶的核糖体结合位点强度相同，改变 crtY 下游的茎环结构 (DG2.9、DG3.6、DG6.0、DG9.4) 来改变核酶切割后 crtY mRNA 的含量以调节通路中最下游 crtY 酶的表达量。实验结果显示 DG9.4 的大肠杆菌呈现橙黄色，DG6.0 的大肠杆菌呈现粉红色，其余呈现米色 (米色说明大肠杆菌内 β -胡萝卜素的合成量不足以使其显色)。实验结果符合预期，DG9.4 茎环稳定 mRNA 的效果最差，因此组内 crtY 酶表达量低，而 crtE、crtB、crtI 酶表达量足够避免通路中代谢产物的堆积；DG6.0 稳定 mRNA 的效果介于 DG3.6 与 DG9.4 之间，crtY 表达量稍多，在通路中红色的番茄红素堆积导致菌落呈现粉红色；DG2.9 和 DG3.6 稳定 mRNA 的效果最佳，crtY 表达量多，导致能量被浪费在需求量不大的 crtY 酶上，大肠杆菌的 β -胡萝卜素产量低，菌苔呈现米色。

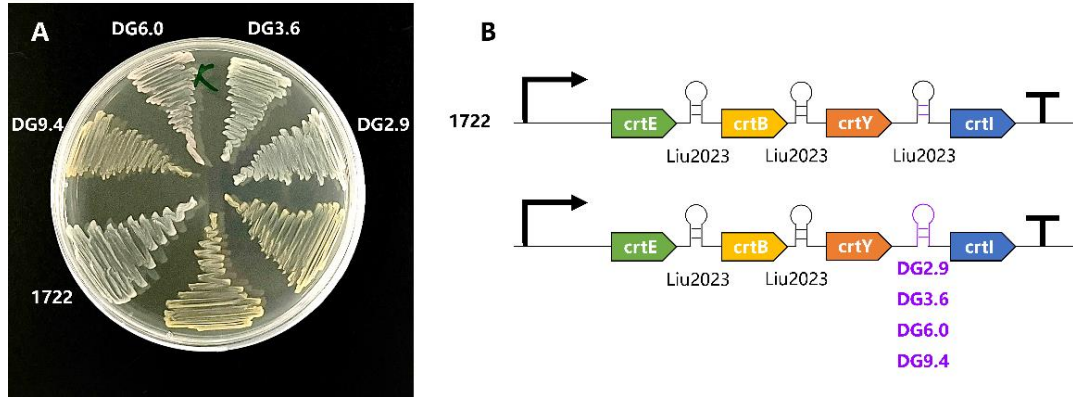


图 20. 改变茎环结构调节 β -胡萝卜素合成途径增加产量

(A) 同图 19A，标示 1722、DG2.9、DG3.6、DG6.0、DG9.4 质粒，合成 β -胡萝卜素的大肠杆菌划线菌苔，分别呈现米色、米色、米色、粉色、橙黄色；(B) 核酶辅助的多顺反子共表达系统中表达 β -胡萝卜素合成途径的四个酶 crtE/B/Y/I，四个蛋白编码序列之间插入自剪切核酶 Twister P1(图中省略)，每一个单顺反子 5'上游由相同的 RBS 起始翻译 (图中省略)，改变单顺反子 3'下游茎环 (Liu2023、DG2.9、DG3.6、DG6.0、DG9.4)

以上该实验成功证实茎环结构可以用于调节代谢通路中酶的相对含量，在代谢工程中，具有重大应用价值。

四、讨 论

4.1 科学意义

在结构生物学和生物工程等领域中，在原核生物中同时、高效、定量调节多个基因的表达是十分重要的。例如在研究蛋白质结构时，大多蛋白质以异聚复合体而非单体或同聚复合体的形式存在。在体外表达蛋白质时，应该同时表达多个蛋白，来模仿其在体内的装配^[28]，最大限度保证蛋白质结构不受影响；另外一个例子是代谢工程中，需要调节级联反应中各个酶的相对表达量，否则中间产物可能会在限速步骤堆积，造成细胞的代谢压力。

本文以 mRNA 的转录后的稳定性作为切入点，希望能通过改变 mRNA 3'非编码序列的茎环结构，来定量调控基因表达。本实验排除了茎环热稳定性、长度与假结结构与 mRNA 稳定性的正相关性，证实了不同茎环可以实现调控 mRNA 稳定性的变化，进而改变基因表达量。后续如果能探究出茎环影响 mRNA 稳定性的多个因素，并进行建模，就可以设计出具有特定 mRNA 稳定性的 3'下游调节序列，这将在生物工程等领域中具有重要的应用前景。

4.2 结果讨论

本研究基于核酶辅助的多顺反子共表达系统 pRAP，将自剪切核酶插入蛋白编码序列中间，从而多顺反子 mRNA 在转录的同时，被自剪切成为多个单顺反子。每一个单顺反子可以通过 5'的核糖体结合位点高效起始翻译。在此基础上，本研究在非末位的单顺反子 3'非翻译区域插入可变的茎环结构，以保护 mRNA 的 3'端不被 3'-5'核酸外切酶降解，增加 mRNA 的稳定性。

本研究围绕单顺反子 3'下游的茎环结构稳定 mRNA 的作用进行了多轮实验，得出的结论包括：

1. 核酶辅助的多顺反子共表达系统中，mRNA 单顺反子尾端茎环结构能够保护 mRNA，增加基因表达量；基因表达量与所在 mRNA 的 3'非翻译区的茎环结构最低自由能不存在明显相关性 (如图 21.A)
2. 串联茎环 (增加茎环长度) 无法叠加 mRNA 稳定性 (如图 21.B)

3. 复杂的 3'末端假结结构不一定能增加 mRNA 稳定性 (如图 21.C)
4. 茎环与核糖体结合位点 RBS 同样可以用于调节代谢通路中酶的相对含量, 提高最终产物的产率。

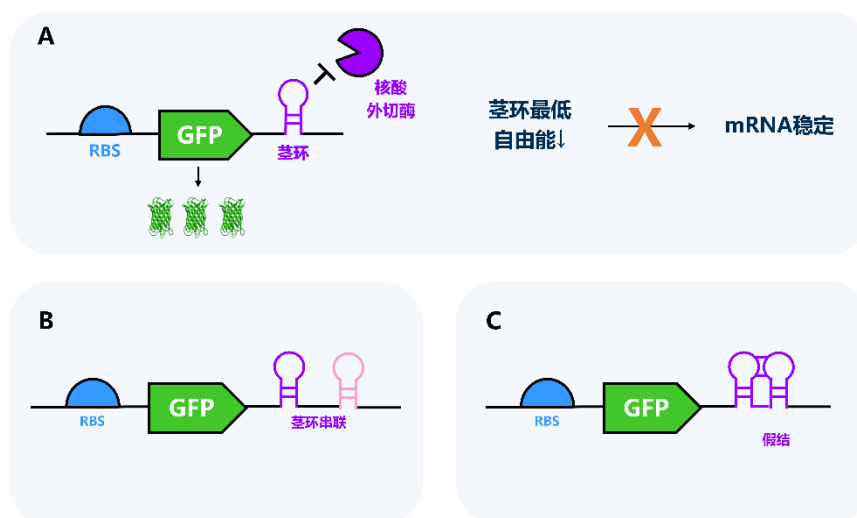


图 21. 总结核酶剪切后单顺反子 3' 末端结构对于 mRNA 稳定性影响

(A) 茎环结构可以降低核酸外切酶对所在 mRNA 的 3' 的降解, mRNA 的基因表达量与所在 mRNA 的 3' 茎环最低自由能无关; (B) 串联茎环无法叠加 mRNA 稳定性; (C) 复杂的假结 结构不一定能稳定 mRNA

本研究进行之前, 我们参考了一篇优化 mRNA 序列的文献: 该文献基于最低自由能 (MFE) 和密码子优化, 设计出了高稳定性的 mRNA。但该文献与本研究得出的结果不相符, 可能是由于该文献关注 mRNA 疫苗开发, 而疫苗中的 mRNA 处于相对组分简单的溶液环境 (*in solution*), 而不像处于体内的复杂环境 (*in vivo*) 中存在具有序列特异性的小调节 RNA (sRNAs)、RNA 结合蛋白、RNA 解旋酶、转录后修饰等。上述多种因素都可能对 mRNA 稳定性产生进一步影响。因此如果将 mRNA 稳定性作为因变量, 热力学稳定性 (MFE) 只是多因素中的一个自变量。无法仅仅根据 RNA 的最低自由能 (MFE), 预测茎环结构在体内稳定 mRNA 的能力。

除了 mRNA 蛋白编码序列 3' 下游的茎环结构会对基因表达量造成影响, 蛋白编码序列中的茎环结构也会造成移码突变, 抑制翻译进行。2022 年有文献发

现具有特定的长度和结构而非热力学上稳定的 mRNA 茎环结构影响核糖体翻译^[26]，与本研究得出的结论一致。

虽然难以根据热力学稳定的参数，预测茎环结构稳定 mRNA 的程度，但是已有多项研究在基因编码序列 3'下游添加特定长度或结构的茎环结构来起到稳定 mRNA、增加基因表达的目的。茎环结合蛋白 (stem-loop binding protein) 与组蛋白 mRNA 的 3'茎环结构形成了一个高度稳定且特异的复合体^[29]，有研究将组蛋白的 3'茎环结构放在人 α -globin 基因下游，发现也能够稳定 mRNA^[30]。还有研究插入重复的基因外回文 (repetitive extragenic palindromic sequence) 序列，形成茎环二级结构^[23]，也能稳定 mRNA，增加基因产物的表达量。

上述笼统地讨论了 3'非翻译区中茎环主体对于 mRNA 稳定性的影响，而本研究中将茎环序列分为间隔 spacer 序列、insert 序列 (茎环主体)、结尾 ending 序列三部分，许多研究发现间隔 spacer 序列和结尾 ending 序列也对 mRNA 稳定性有较大的影响。有文献指出 mRNA 中蛋白编码序列终止密码子与茎环结构之间的间隔 spacer 序列至少需要 12 bp 才能减小茎环对于核糖体翻译终止的空间位阻影响^[23]。从 3'末端降解 mRNA 的核酸外切酶 PNPase 和 RNase II 不仅难以降解具有复杂茎环结构的 RNA，且在切割之前需要结合一定长度 (6-10 bp) 长度的 RNA 单链才能高效地起始降解的过程^{[12]、[31]}；且原核生物中 mRNA 的 poly (A) 尾可以加速 mRNA 被降解^[32]。因此，为增加 pRAP 系统非末端单顺反子的稳定性，除了添加稳定 mRNA 效果好的茎环主体，还需要保证茎环主体上游有足够长度 (>12 bp) 的间隔序列，以及茎环主体下游较短且不含有串联 A 的 RNA 单链 (<6 bp)。

此外，也有研究指出原核生物 mRNA 的降解途径中，mRNA 主要先经历核酸内切酶处理，后被 3'-5'核酸外切酶降解^{[15]、[33]}。添加 mRNA 的 3'非翻译区茎环结构仅从 mRNA 降解的下游步骤保护目标 mRNA，有可能对稳定 mRNA 的贡献不够大。

4.3 存在问题及研究展望

本研究在以下方面存在局限性，有待进一步的实验探究：

- ◆ 茎环序列设计: RNA 的最低自由能 MFE 设置范围过小; RNA 序列长度与最低自由能 MFE 呈现正相关^[35], 第一部分实验中应该控制 RNA 序列长度相同; 难以避免茎环与蛋白编码序列、茎环与核酶自剪切效率的影响。后续可以进一步设计最低自由能 MFE 更低的二级结构, 测试其 mRNA 稳定性
- ◆ 茎环调节基因表达的效率: mRNA 的 3'非翻译区的茎环通过改变 mRNA 稳定性来调控基因的表达, 而 mRNA 的 5'非翻译区的核糖体结合位点 RBS 通过改变翻译起始效率来调控基因的表达。为了比较茎环与 RBS 调节基因表达的效率, 在本研究中, 实验体系虽然使用了 T7 启动子但没有使用 IPTG 诱导转录, 由于 mRNA 量较少, 核糖体足够, 不同强度的 RBS 结合核糖体的竞争关系不明显, 使 RBS 调节基因表达的阈值范围较小, 有利于研究茎环调节, 并达到了类似 RBS 调节基因表达的效果 (如图 19, 20)。同期丁晓桦同学的毕业论文, 比较了添加与不添加 IPTG 实验组的基因相对表达量, 添加 IPTG 增加转录速度后, 上下游之间基因相对表达量增大, 证明使用 IPTG 诱导后更多 mRNA 未被切割就被翻译, 该实验条件不利于验证 mRNA 降解对多顺反子表达的影响, 实验结果支持我所采用的利用非 IPTG 诱导、T7 启动子泄漏表达的研究策略。
- ◆ 茎环抑制核酸内切酶降解: mRNA 降解首先经历核酸内切酶, 后被核酸外切酶处理, 且核酸内切酶从 mRNA 的 5'上游进入特定的识别内切位点^[34], 并对二级结构敏感而无法切割复杂的二级结构。后续可以在 mRNA 的 5'上游添加复杂的二级结构, 也可以在设计序列时通过无义突变来规避核酸内切酶偏好切割的碱基序列, 从而增加 mRNA 稳定性, 提高基因表达量。另外, 核酶自剪切后通常会留下茎环结构 (Twister P1 切割后, 会在 mRNA 的 5'端留下茎环)。后续可以探究核酶切割留下的 5'茎环是否也可以保护 mRNA 不受核酸内切酶降解。

参考文献

- [1] Anthony J R, Anthony L C, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(1): 13-19.
- [2] Abdelaal A S, Yazdani S S. A genetic toolkit for co-expression of multiple proteins of diverse physiological implication[J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00692.
- [3] Martin P, Albagli O, Poggi M C, et al. Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity[J]. *BMC Biotechnology*, 2006, 6(1): 4.
- [4] Liu Y, Wu Z, Wu D, et al. Reconstitution of Multi-Protein Complexes through Ribozyme-Assisted Polycistronic Co-Expression[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(1): 136-143.
- [5] Kruger K, Grabowski P J, Zaug A J, et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*[J]. *Cell*, 1982, 31(1): 147-157.
- [6] Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, et al. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme[J]. *Cell*, 1983, 35(3): 849-857.
- [7] Li Y, Guerrier-Takada C, Altman S. Targeted cleavage of mRNA in vitro by RNase P from *Escherichia coli*. [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(8): 3185-3189.
- [8] Yuan Y, Hwang E S, Altman S. Targeted cleavage of mRNA by human RNase P.[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(17): 8006-8010.
- [9] Jimenez R M, Polanco J A, Lupták A. Chemistry and biology of self-cleaving ribozymes[J]. *Trends in biochemical sciences*, 2015, 40(11): 648-661.
- [10] Roth A, Weinberg Z, Chen A G Y, et al. A widespread self-cleaving ribozyme class is revealed by bioinformatics[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(1): 56-60.
- [11] Chen Y, Cheng Y, Lin J. A scalable system for the fast production of RNA with homogeneous terminal ends[J]. *RNA Biology*, 2022, 19(1): 1077-1084.
- [12] Spickler C, Mackie G A. Action of RNase II and Polynucleotide Phosphorylase against RNAs Containing Stem-Loops of Defined Structure[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(9): 2422-2427.
- [13] Cheng Z F, Zuo Y, Li Z, et al. The vacB Gene Required for Virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* Encodes the Exoribonuclease RNase R *[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(23): 14077-14080.
- [14] Cannistraro V J, Kennell D. The Processive Reaction Mechanism of Ribonuclease II[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 243(5): 930-943.
- [15] Spickler C, Mackie G A. Action of RNase II and Polynucleotide Phosphorylase against RNAs Containing Stem-Loops of Defined Structure[J]. *Journal of*

- Bacteriology, 2000, 182(9): 2422-2427.
- [16] Salis H M, Mirsky E A, Voigt C A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(10): 946-950.
 - [17] Pandey N B, Marzluff W F. The Stem-Loop Structure at the 3' End of Histone mRNA is Necessary and Sufficient for Regulation of Histone mRNA Stability[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7(12): 4557-4559.
 - [18] Zuker M, Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information[J]. *Nucleic Acids Research*, 1981, 9(1): 133-148.
 - [19] Zhang H, Zhang L, Lin A, et al. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity[J]. *Nature*, 2023, 621(7978): 396-403.
 - [20] Liu H, Naismith J H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol[J]. *BMC Biotechnology*, 2008, 8(1): 91.
 - [21] Hirano M, Ando R, Shimozone S, et al. A highly photostable and bright green fluorescent protein[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(7): 1132-1142.
 - [22] Bindels D S, Haarbosch L, Van Weeren L, et al. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(1): 53-56.
 - [23] Deng C, Lv X, Li J, et al. Synthetic repetitive extragenic palindromic (REP) sequence as an efficient mRNA stabilizer for protein production and metabolic engineering in prokaryotic cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(1): 5-18.
 - [24] Nelson J W, Randolph P B, Shen S P, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(3): 402-410.
 - [25] Mohanty B K, Kushner S R. Regulation of mRNA decay in *E. coli*[J]. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2022, 57(1): 48-72.
 - [26] Bao C, Zhu M, Nykonchuk I, et al. Specific length and structure rather than high thermodynamic stability enable regulatory mRNA stem-loops to pause translation[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 988.
 - [27] Wu Y, Yan P, Li Y, et al. Enhancing β -Carotene Production in *Escherichia coli* by Perturbing Central Carbon Metabolism and Improving the NADPH Supply[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 585.
 - [28] Romier C, Ben Jelloul M, Albeck S, et al. Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: Experimental procedures, database tracking and case studies[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2006, 62(10): 1232-1242.
 - [29] Battle D J, Doudna J A. The stem-loop binding protein forms a highly stable and specific complex with the 3' stem-loop of histone mRNAs.[J]. *RNA*, 2001, 7(1): 123-132.
 - [30] Pandey N B, Marzluff W F. The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability.[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7(12): 4557-4559.

- [31] Cheng Z F, Deutscher M P. Purification and Characterization of the Escherichia coli Exoribonuclease RNase R[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(24): 21624-21629.
- [32] O'Hara E B, Chekanova J A, Ingle C A, et al. Polyadenylation helps regulate mRNA decay in Escherichia coli.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(6): 1807-1811.
- [33] Donovan W P, Kushner S R. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(1): 120-124.
- [34] Chao Y, Li L, Girodat D, et al. In Vivo Cleavage Map Illuminates the Central Role of RNase E in Coding and Non-coding RNA Pathways[J]. Molecular Cell, 2017, 65(1): 39-51.
- [35] Trotta E. On the Normalization of the Minimum Free Energy of RNAs by Sequence Length[J]. PLOS ONE, 2014, 9(11): e113380.

致 谢

感谢遇到过最好的蔡亮老师，在课堂中、实验室里、微信上给予了我无尽的支持与指导，从大一的“大胆问”到大四的“你自己思考”，教会我变得勇敢再到独立思考，并在人生的重要十字路口上推了我一把，让我有勇气迈出自己的舒适圈，向未知走去。

感谢本科途中给予我很多帮助的老师 and 前辈，尤其是王陈继老师、孙璘老师、史晴师姐、慧莹师姐、方队、容璐学姐、昌澄学长、婧怡学姐、圣妍学姐、宇慧学姐和姜导，你们以身作则，告诉我什么是对于从事事业的热忱。

感谢世界上最棒的爸爸妈妈，永远无条件支持我做出的所有选择，默默为我承担风险，以我为骄傲。

感谢亲爱的男朋友天语同学，为我的生活染上了丰富的色彩，忠实地陪伴在我身边，总是在我迷茫与自我怀疑时，鼓励我并提供建设性的意见，给予我向前的底气。

感谢 iGEM 的小伙伴们，为我的毕业设计提供了很多支持的厉害的阿越，最靠谱的董哲，温暖开朗的的清荧，腼腆负责的思量，开心果臻茂，救火队长之恺，美工大师茗芳，文笔很好的陈烨，充满生活情趣的小涵，参加 iGEM 是我大学当中做过最棒的决定，你们让我在复旦有了归属感。

感谢志同道合的好朋友们，一直都在的乐乐，温暖的好雨，爱种花的蕴颖，远在英国沛羽，沉迷历史的顺吉，独立自主的艾婧，人生导师朵朵，你们的优秀不断激励我向前追赶。

感谢一路上遇到的所有人。

最后，感谢一直坚持的自己。