

导入细胞基因的表达诊断

Diagnosis of the expression of genes introduced to cells

加藤 晃, 山崎 将太郎, 成瀬 月日 奈良先端科学技术大学院大学 生物科学领域 植物代谢控制研究室

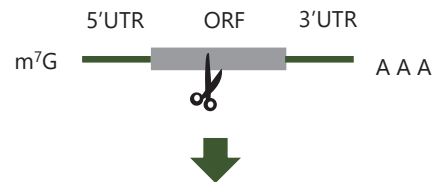
mRNA总是以一定的概率分解，其分解取决于mRNA序列/结构。

虽然此前已有关于mRNA内部切割位点的全面鉴定方法的报告，但为了取得更详细的鉴定，我们建立了更为全面并且可以定量分析的Truncated RNA end sequencing (TREseq)。

该技术可以详细分析对象mRNA的切割位点及切割量，并且可以建立针对各靶基因进行优化的表达系统。

mRNA降解途径

1. 核酸内切

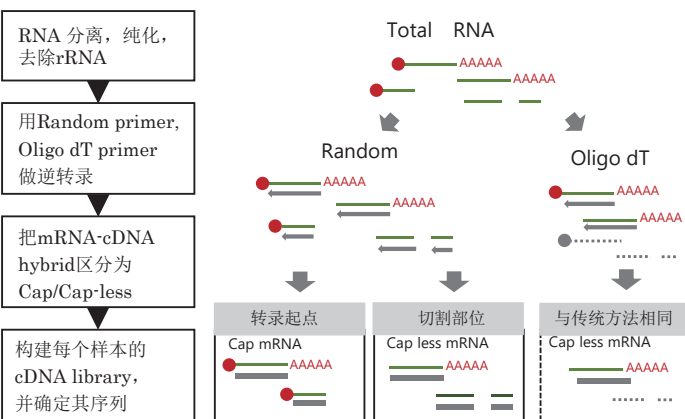


2. 核酸外切

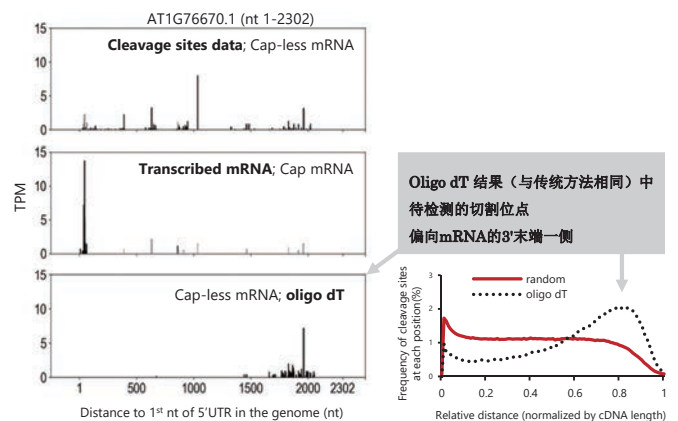


核酸内切酶介导的mRNA降解

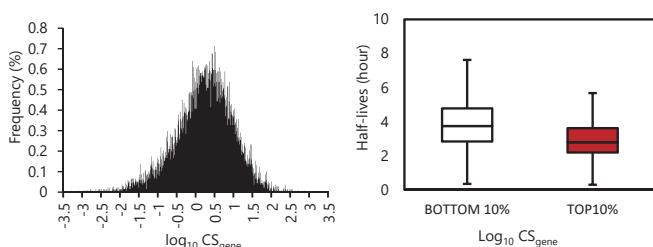
TREseq | 裁短RNA末端测序



准确的切割位点鉴定 | 与常规方法的比较

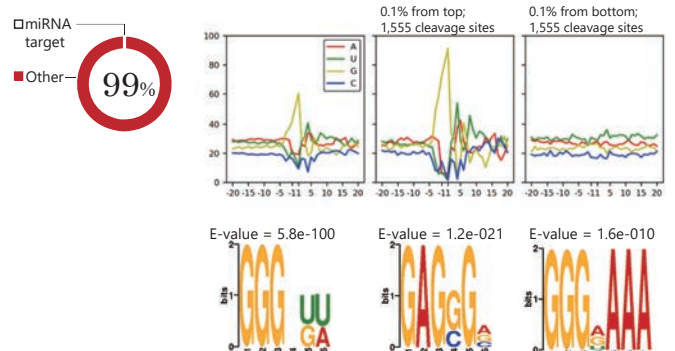


mRNA 切割效率的推断



$$CS = \frac{\text{切割位点的TPM (tags per million)}}{\text{mRNA 丰度 (转录起点的TPM)}}$$

在切割位点附近发现新的基序



预期用法 示例

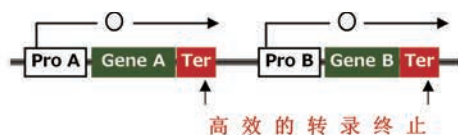
- ◆ mRNA内切位点全面分析
- ◆ 导入细胞的来自外来基因的mRNA切割位点分析
- ◆ 使用检测到的内切点发生突变以实现mRNA的稳定化

能够稳定高效发现植物中的导入基因的基本技术

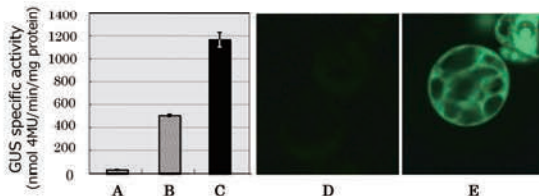
加藤 晃, 山崎 将太郎, 成瀬 月日 奈良先端科学技术大学院大学 生物科学领域 植物代谢控制研究室

高效的转录终止

- ◆ 提高启动子活性mRNA量的转换效率
- ◆ 选择终止子



A	35S	GUS	NOS	pBI121
B	35S	NtADH	GUS	NOS
C	35S	NtADH	GUS	HSP-ter
D	35S	GFP	NOS	pBI221
E	35S	AtADH	GFP	HSP-ter



提高翻译效率

- ◆ 提高每单位mRNA的翻译效率
- ◆ 利用持续被活跃翻译的mRNA的5'UTR

提取有助于高效翻译的5'UTR

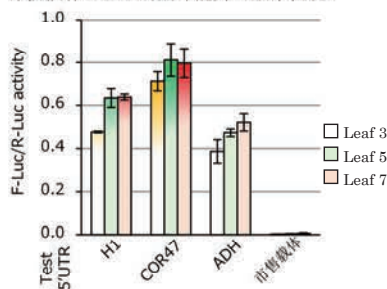
开发出能够在各种条件下识别出始终被活跃翻译的mRNA, 并利用其5'UTR的引入基因高表达系统

- 分析mRNA的翻译状态
- 选定候补的mRNA
- 评估翻译能力

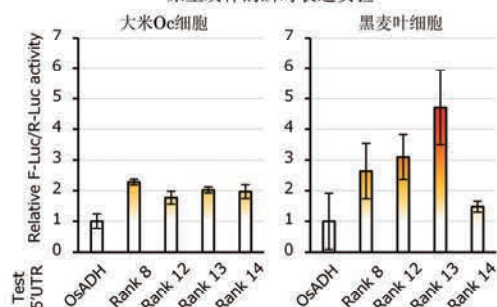
AtADH	双子叶	即使在环境压力下, 翻译也不会受到抑制	专利5769173
COR47	双子叶	植物的生长和发育不会抑制翻译	专利申请2017-515524
***	单子叶	提高单子叶植物的翻译效率	专利申请2018-77249



运用农杆菌渗入法 评估候补5'UTR的翻译能力 (烟草植物)



原生质体的瞬时表达实验



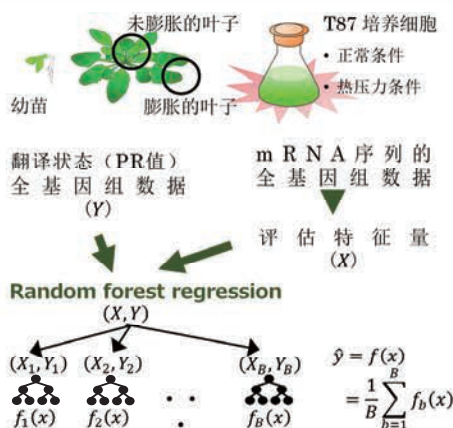
构建一个能够通过机器学习预测翻译状态的数学模型

构建一个根据mRNA的序列预测翻译状态的数学模型, 并对使用该数学模型的现有表达系统的翻译能力进行评估与提高

- 序列和翻译状态数据
- 机器学习
- 验证预测精度

构建数学模型

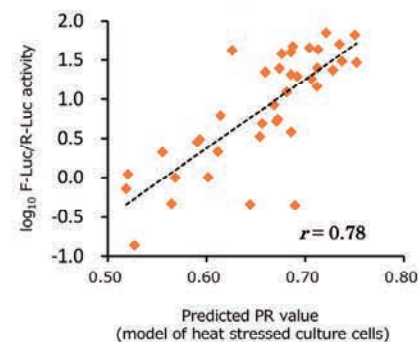
拟南芥(Arabidopsis thaliana)在各种条件下的数学模型



验证数学模型

数学模型充分解释实际的翻译效率

预测拟南芥T87培养细胞在热压力条件下的原生质体瞬时表达实验结果



预期用法示例

- ◆ 应用性广泛的高表达载体
- ◆ 评估目前使用的表达系统 (mRNA稳定性评估, 翻译能力评估)
- ◆ 选择能够实现目的基因高翻译的5'UTR序列
- ◆ 运用遗传算法对序列进行次优化, 以得取最大化目的基因翻译效率