

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102146344 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 10

(21) 申请号 201010528723. 0

C12P 3/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 02

C12Q 1/68 (2006. 01)

(71) 申请人 上海师范大学

G01N 33/53 (2006. 01)

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

G01N 21/31 (2006. 01)

(72) 发明人 吴双秀 许丽丽 阎光宇 黄瑞
王全喜

C12R 1/89 (2006. 01)

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有
限公司 31227

代理人 杨杰民

(51) Int. Cl.

C12N 1/12 (2006. 01)

C12N 15/52 (2006. 01)

C12N 15/29 (2006. 01)

C12N 15/82 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

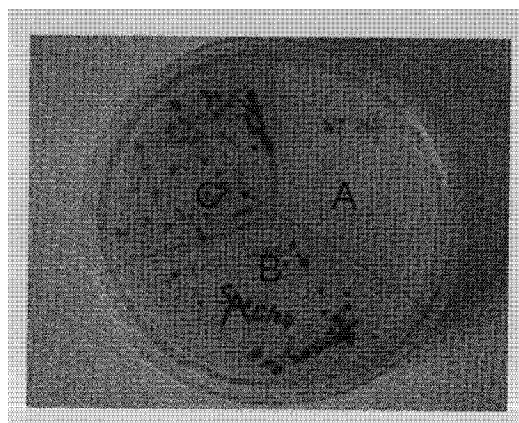
权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图 3 页

(54) 发明名称

优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法

(57) 摘要

本发明涉及外源基因表达和生物制氢技术, 优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法。现有技术外源豆血红蛋白基因 hemH 和 lba 在莱茵衣藻叶绿体中的表达效率低, 影响莱茵衣藻产氢量的提高。本发明公开了一种对豆血红蛋白基因 hemH 和 lba 的密码子偏向性分别优化的方法, 并将密码子优化后的 hemHc 和 lbac 基因转入莱茵衣藻叶绿体中表达。本发明的优点是: 显著提高了外源重组蛋白的表达量, 外源豆血红蛋白 hemH 和 Lba 在莱茵衣藻叶绿体中的表达量提高 6.8 倍; 莱茵衣藻产氢量比转未优化密码子的 hemH 和 lba 基因的莱茵衣藻提高 22%; 本发明适用于具有密码偏向性的更多物种的外源基因表达调控。



1. 一种优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法,步骤如下:

(1) 莱茵衣藻培养:

A、选细胞壁缺欠型莱茵衣藻藻种 cc849;

B、培养莱茵衣藻藻种:

(a) 正常培养条件:温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$;日光灯光照强度 $100 \sim 200$ 微摩尔光量子/平方米·秒; $50 \sim 100\text{ml}$ TAP 培养基液体培养,初始 pH7.2,水平摇床转速 $100 \sim 130\text{rpm}$,每 $5 \sim 6$ 天 1%接种继代培养;

(b) 固体平板 TAP 培养基:琼脂粉 1.5%;挑取平板上的莱茵衣藻单克隆通过划线方法接种在平板上保存和纯化藻种,每 3 周继代一次;

C、产氢培养条件:在缺硫培养基中进行,把 TAP 培养基的硫酸镁、硫酸铁、硫酸铜和硫酸锌分别换为等摩尔的氯化镁、氯化铁、氯化铜和氯化锌;将生长至对数期后期的莱茵衣藻 3000rpm 室温离心 5min,收集藻细胞并用缺硫培养基洗 3 次,悬浮在缺硫培养基内,分别装在培养瓶内,培养瓶上方留 10ml 的空间,橡皮塞密闭;黑暗条件下培养 24 小时,然后放在连续光照条件下培养,光照强度 $50 \sim 100$ 微摩尔光量子/平方米·秒,温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$;每 24 小时进行气体成分和含量检测一次;

D、气相色谱仪测定氢气和氧气含量:分子筛 $5 \times 1/8$,柱长 2m,内径 3mm,热导检测器 TCD,以氩气作为载气,柱温 50°C ,进样温度 200°C ,热导检测温度 300°C ;

(2) 豆血红蛋白 hemHc 基因和 lba 基因的密码子优化和合成:

A、从 GenBank 中调取序列号为 M92427 的慢生大豆根瘤菌 hemH 基因序列和序列号为 V00453 的大豆 lba 基因序列;

B、将豆血红蛋白 hemH 基因和 lba 基因的密码子对应的 DNA 核苷酸序列中第三位碱基对应的 DNA 核苷酸序列中的鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C) 改为腺嘌呤 (A) 或胸腺嘧啶 (T);将优化后的基因命名为 hemHc 和 lba;分别在 hemHc 基因的 5' 端和 3' 端加上限制性内切酶 SacII 的酶切位点序列;在 lba 基因的 5' 端和 3' 端加上限制性内切酶 Sma I 和 Sac I 的酶切位点序列;

C、将优化后的 hemHc 基因和 lba 基因的核苷酸序列以及添加的相应的限制性内切酶酶切位点核苷酸序列进行核苷酸序列合成;

(3) hemHc 基因和 lba 基因的扩增:

A、以步骤 (2)C 合成的 hemHc 基因和 lba 基因核苷酸序列为模板,进行聚合酶链式反应,分别扩增 hemHc 基因和 lba 基因;反应条件: 94°C 预变性 5min,一个循环; 94°C 变性 30s, hemHc 基因 58°C , lba 基因 59°C ;退火 30s, 72°C 延伸 1.5min;30 个循环; 72°C 延伸 15min;反应产物分别纯化回收,用于测序鉴定和下一步莱茵衣藻叶绿体转化载体的构建;

B、PCR 扩增、测序鉴定以及 hemHc 基因和 lba 基因转录表达检测的特异性引物:

hemHc 基因的特异性引物为:

hemHc-P1 :5' - *GCGGCCG* *Caaggaggg* atgtcaacagcagctccaaatgaa-3', 斜体表示 SacII 酶切位点序列,方框中的序列是加入的增强翻译能力的 RBS 序列;

hemHc-P2 :5' - *GCGGCCGCc* tatatccaaccttgaagttcacgta-3', 斜体表示 SacII 酶切位点序列;

1bac 基因的特异性引物为：

Lbac-P1 :5'-c *gag ct**agggaggg*ttatgcttttttaataagctgctgc-3', 斜体表示 SmaI 酶切位点序列, 方框中的序列是加入的增强翻译能力的 RBS 序列；

Lbac-P2 :5' -tcc *ccc ggg* atggttgcttttactgaaaaacaa-3', 斜体表示 SacI 酶切位点序列；

(4) 莱茵衣藻叶绿体表达载体的构建：

A、将步骤 (3) PCR 扩增并纯化回收的 hemHc 基因片段和 1bac 基因片段分别用限制性内切酶 SacII 酶切和用 SmaI 和 SacI 酶切；将纯化的 1bac 基因片段通过上述酶切位点用 T4DNA 连接酶连接质粒 cg401-1 中的 aadA 基因之后, 形成 aadA-1bac 融合基因, 得到载体 cg401-1-1bac；用 SacII 酶切位点将 hemHc 基因用 T4DNA 连接酶连入到质粒 cg401-1-1bac 中 aadA 基因之后和 1bac 基因之前, 形成 aadA-hemHc-1bac 融合蛋白, 构建得到衣藻叶绿体表达载体 cg401-1-hemHc-1bac；转化大肠杆菌 DH5 α , 用于保存、鉴定和大量制备质粒 DNA；

(4) 莱茵衣藻叶绿体的转化：

A、取 100ml 对数期中后期的莱茵衣藻, 25°C, 3000rpm 离心 5min 收集藻细胞, 用新鲜 TAP 洗三次, 涂于新鲜 TAP 固体平板上；光照 100 微摩尔光量子 / 平方米 · 秒, 25 \pm 1°C 条件下培养 24 小时；基因枪轰击转化；真空度 9.48192×10^4 Pa, 轰击距离 9cm, 氦气压力 7.584236×10^6 Pa, 金粉子弹经限制性内切酶 EcoRI 酶切质粒 cg401-1-hemHc-1bac DNA 包裹, 金粉子弹颗粒直径 1.0 微米；

B、转化后的衣藻在光照和 25 \pm 1°C 条件下, 过渡培养 18h, 用 TAP 液体培养基冲洗, 涂布于含壮观霉素 100 μ g/ml 的 TAP 固体选择培养基上, 25 \pm 1°C, 100 微摩尔光量子 / 平方米 · 秒连续光照, 培养约 7 ~ 15 天；取有抗性的单藻落分别在选择培养基上多次继代培养；分别进行产氢培养, 并检测产氢量和耗氧量；

(5) 分析转基因莱茵衣藻中 hemHc-1bac 基因的整合及其表达：

A、hemHc 1bac 基因整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA 的检测：

a、hemHc 基因和 1bac 基因同源重组交换整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA, 以转基因衣藻总 DNA 为模板的 PCR 产物为 5254bp；未整合的 PCR 产物是 3732bp；与莱茵衣藻叶绿体 DNA 结合的引物是 cpDNA-P1 :5'

-aacatgctaagttttacaagccccgaag-3'；cpDNA-P2 :5'

-gtctttatgagccgccccgaag-3'；

b、取对数生长后期的衣藻培养液, 4°C 低速离心收集, 加 350 μ l DNA 提取液 0.1mol/L 氯化钠, 50mmol/L 乙二胺四乙酸, 20mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸, pH 8.0, 重悬沉淀；加入 25 μ l 10mg/ml 的蛋白酶 K 及 25 μ l 20% 十二烷基硫酸钠, 混匀 37°C 水浴 12 小时, 冰上冷却；加入 200 μ l 5mol/L 醋酸钾, 静置离心；上清液中加入等体积 25 : 24 : 1 的酚 / 氯仿 / 异戊醇溶液抽提 2 次, 再用等体积的氯仿抽提 1 次, 总 DNA 用无水乙醇沉淀和 70% 乙醇洗涤, 干燥后溶于 30 μ l 三羟甲基氨基甲烷 - 乙二胺四乙酸缓冲液；

B、转基因莱茵衣藻中 hemHc 基因和 1bac 基因转录的检测：

取对数生长期中期的莱茵衣藻, 室温 3000rpm 离心 5 分钟收集藻细胞, 提取总 RNA, 反转录 cDNA；利用 hemHc 基因和 1bac 基因的特异性引物和扩增 hemHc 基因和 1bac 基因所述的

PCR 条件扩增,进行 hemHc 基因和 lba 基因转录水平的检测;

C、转基因莱茵衣藻中重组蛋白 hemH 和 Lba 表达量的检测:

a、按下列配比制备蛋白提取缓冲液:50mM 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 pH 8.3 含 1% 曲拉通;上样缓冲液:0.25M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸, pH 8.0;25% 甘油;7.5% 十二烷基硫酸钠;0.25mg ml⁻¹ 溴酚兰;12.5% β-巯基乙醇;

b、取产氢培养的莱茵衣藻培养液,室温,3000rpm 离心 5min 收集藻细胞,用 250 μl 蛋白提取缓冲液悬浮,加入 2 μl β-巯基乙醇,液氮冻融三次;4℃ 条件下离心 20min;取 200 μl 蛋白上清液加入 100 μl 上样缓冲液,用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行凝胶电泳,转聚偏氟乙烯膜;分别用抗 hemH 多克隆抗体和抗 Lba 多克隆抗体做免疫杂交检测,再对 HRP 标记的抗体进行化学发光检测;

(6) 分析重组豆血红蛋白 hemH-Lba 对莱茵衣藻生长的影响:

A、双光束紫外可见分光光度计检测莱茵衣藻在 750nm 处的吸光度;

B、取藻液 3000rpm 离心 5min 收集藻细胞,加入同体积的 95% 乙醇溶液,混合均匀,室温避光放置 20min,4℃,12000rpm 离心 10min;取上清,测定 665 纳米吸光度值及 649 纳米吸光度值的吸光值;

C、计算总叶绿素的含量,单位 mg/L:

叶绿素 Chl mg/L = 20.04 × OD₆₄₉ + 6.10 × OD₆₆₅;

(7) 分析重组豆血红蛋白 hemH-Lba 对莱茵衣藻产氢培养的耗氧量和产氢量的影响:

A、黑暗呼吸耗氧和缺硫培养基中耗氧量以及产氢量的检测;

B、快速充氩气耗氧和缺硫培养基中产氢量的检测。

2. 根据权利要求 1 所述的优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法,其特征在于:TAP 培养基为三羟甲基氨基甲烷-乙酸-磷酸盐培养基。

优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及外源基因表达和生物制氢技术,具体地说是一种优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法。

背景技术

[0002] 光合生物制氢是未来清洁能源的重要来源之一,包括莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 在内的许多微型绿藻和蓝藻可以在缺氧的条件下诱导细胞内的氢酶 (H_2ase) 基因表达,将光合作用中产生的 H^+ 和 e^- 合成 H_2 , 释放到细胞外。这项技术是利用太阳能生产氢气的理想模式:莱茵衣藻生长速度快,培养成本低,氢酶活性高,是极有开发潜力的微藻光合制氢藻种。但是,氢酶对氧气极其敏感,很容易受氧气的抑制而失去活性,而氧气又是衣藻光合作用的主要产物,这一对矛盾限制了衣藻产氢技术的应用。为了提高衣藻光合产氢的效率,需要尽可能的降低衣藻细胞内的氧气含量或者提高氢化酶的氧耐受性。

[0003] 豆科植物根瘤中的固氮酶与氢酶有相似的特性,也对氧气敏感,但是根瘤中的固氮酶却有很高的固氮活性,这与根瘤细胞中含有大量的豆血红蛋白 leghemoglobin, 简称 Lb, 有着密切的关系。豆血红蛋白有两个亚基构成,一个是球蛋白亚基,由豆科植物合成;另一个是血红素辅基,由共生的根瘤菌合成,两个亚基结合成为有活性的豆血红蛋白。豆血红蛋白具有与氧气可逆结合、降低细胞内氧浓度和调节呼吸作用的特性,既能维持根瘤细胞内较低的氧气含量,又能保障呼吸作用需氧和固氮需要的能量。中国专利 200380107352.7 和 02138702.8 分别公开了利用表达豆血红蛋白改变植物贮藏储备物含量和提高植物抗涝能力。生物发酵工程的已有技术中也有应用其它血红蛋白体外重组表达而使产量提高的报导。

[0004] 在植物细胞内,尤其是叶绿体中,存在着血红素辅基合成的前体,即可以通过叶绿素合成途径的原卟啉在根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 亚铁螯合酶 (ferrochelatase) 催化下合成血红素辅基 (Sangwan 和 O'Brain, 1991; Santana 等, 1998)。本发明人曾将大豆血红蛋白球蛋白亚基 lba 基因转入莱茵衣藻叶绿体中表达使转基因莱茵衣藻产氢量提高了 50% (中国发明专利申请号 201010107922.4); 将根瘤菌亚铁螯合酶基因 hemH 与 lba 基因共同转入莱茵衣藻叶绿体中表达使转基因莱茵衣藻产氢量提高了 4 倍 (中国发明专利申请号 201010115015.4)。

[0005] 莱茵衣藻叶绿体基因表达的密码子具有明显的腺嘌呤 (A) 和尿嘧啶 (U) 偏向性 (Nakamura et al., 2000), 2002 年, Franklin 等在莱茵衣藻叶绿体中成功表达了密码子优化的绿色荧光蛋白基因 GFP 基因, 表达量提高了 80 倍。随后在 2003 年和 2004 年 Mayfield 等将密码子优化后的报告基因 luxCt 转入莱茵衣藻叶绿体, 该基因得到了成功表达并具有活性。1991 年 Goldschmidt-Clermont 构建的 aadA 基因表达原件之所以能用于莱茵衣藻叶绿体转化筛选的标签是因为 z 在构建时考虑了它的密码子偏向性与衣藻叶绿体中密码子的偏向性一致。Franklin 和 Mayfield 2004 年指出莱茵衣藻的核基因组也具有密码子的偏向性。2004 年, Gustafsson 等提出其它的一些生物体包括原核 (Dos 和 Wernisch, 2003) 和

真核生物 (Kanaya 等, 2001) 也具有密码子的偏向性。2005 年, Liu 等指出在高等植物中也存在密码子的偏向性, 同年 Lavner 和 Kotlar 指出人类基因组也存在密码子的偏向性。因此, 除了启动子、内含子和 5' UTRs 和 3' UTRs 之外, 在外源基因的表达中密码子偏向性也是一个重要的调控因子。

[0006] 因此发明一种利用密码偏向性进行密码子优化, 并将优化后的 hemHc 基因和 lba 基因转入莱茵衣藻的叶绿体内表达, 提高豆血红蛋白基因表达量和莱茵衣藻产氢量的方法是十分重要的。

[0007] 本发明首次对豆血红蛋白亚铁螯合酶基因 hemH 和大豆血红蛋白球蛋白亚基基因 lba 按照衣藻叶绿体基因表达的 A、U 密码偏向性进行密码子优化, 并将优化后的 hemHc 基因和 lba 基因转入莱茵衣藻的叶绿体内表达, 结果使重组蛋白 hemH 和 Lba 的表达量提高了 6.8 倍, 使转基因莱茵衣藻的产氢量进一步提高了 22%。本发明方法解决了外源基因在莱茵衣藻叶绿体中表达量低的技术难题, 具有实用性, 而且为进一步利用豆血红蛋白特性提高衣藻产氢的生物工程技术提供理论和实验基础。随着生物制氢技术的发展, 本发明将显现出越来越大的实用性和重要性。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种对豆血红蛋白基因 hemH 和 lba 的密码子偏向性进行优化的方法, 使之更适合于在莱茵衣藻叶绿体中表达, 提高外源基因在莱茵衣藻叶绿体中表达量和提高莱茵衣藻及其它微藻制氢产量的方法。

[0009] 本发明的目的是这样实现的:

[0010] 一种优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法, 步骤如下:

[0011] (1) 莱茵衣藻培养:

[0012] A、选细胞壁缺欠型莱茵衣藻藻种 cc849;

[0013] B、培养莱茵衣藻藻种:

[0014] (a) 正常培养条件: 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 日光灯光照强度 $100 \sim 200$ 微摩尔光子 / 平方米 · 秒; $50 \sim 100\text{ml}$ TAP 培养基液体培养, 初始 pH7.2, 水平摇床转速 $100 \sim 130\text{rpm}$, 每 5 ~ 6 天 1% 接种继代培养;

[0015] (b) 固体平板 TAP 培养基: 琼脂粉 1.5%; 挑取平板上的莱茵衣藻单克隆通过划线方法接种在平板上保存和纯化藻种, 每 3 周继代一次;

[0016] C、产氢培养条件: 在缺硫培养基中进行, 把 TAP 培养基的硫酸镁、硫酸铁、硫酸铜和硫酸锌分别换为等摩尔的氯化镁、氯化铁、氯化铜和氯化锌; 将生长至对数期后期的莱茵衣藻 3000rpm 室温离心 5min, 收集藻细胞并用缺硫培养基洗 3 次, 悬浮在缺硫培养基内, 分别装在培养瓶内, 培养瓶上方留 10ml 的空间, 橡皮塞密闭; 黑暗条件下培养 24 小时, 然后放在连续光照条件下培养, 光照强度 $50 \sim 100$ 微摩尔光子 / 平方米 · 秒, 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 每 24 小时进行气体成分和含量检测一次;

[0017] D、气相色谱仪测定氢气和氧气含量: 分子筛 $5 \times 1/8$, 柱长 2m, 内径 3mm, 热导检测器 TCD, 以氩气作为载气, 柱温 50°C , 进样温度 200°C , 热导检测温度 300°C ;

[0018] (2) 豆血红蛋白 hemHc 基因和 lba 基因的密码子优化和合成:

[0019] A、从 GenBank 中调取序列号为 M92427 的慢生大豆根瘤菌 hemH 基因序列和序列号

为 V00453 的大豆 lba 基因序列；

[0020] B、将豆血红蛋白 hemH 基因和 lba 基因的密码子对应的 DNA 核苷酸序列中第三位碱基对应的 DNA 核苷酸序列中的鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C) 改为腺嘌呤 (A) 或胸腺嘧啶 (T)；分别在 hemHc 基因的 5' 端和 3' 端加上限制性内切酶 SacII 的酶切位点序列；在 lba 基因的 5' 端和 3' 端加上限制性内切酶 Sma I 和 Sac I 的酶切位点序列；

[0021] C、将优化后的 hemHc 基因和 lba 基因的核苷酸序列以及添加的相应的限制性内切酶酶切位点核苷酸序列进行核苷酸序列合成；

[0022] (3) hemHc 基因和 lba 基因的扩增：

[0023] A、以步骤 (2) C 合成的 hemHc 基因和 lba 基因核苷酸序列为模板，进行聚合酶链式反应，分别扩增 hemHc 基因和 lba 基因；反应条件：94℃ 预变性 5min，一个循环；94℃ 变性 30s，hemHc 基因 58℃，lba 基因 59℃；退火 30s，72℃ 延伸 1.5min；30 个循环；72℃ 延伸 15min；反应产物分别纯化回收，用于测序鉴定和下一步莱茵衣藻叶绿体转化载体的构建；

[0024] B、PCR 扩增、测序鉴定以及 hemHc 基因和 lba 基因转录表达检测的特异性引物：

[0025] hemHc 基因的特异性引物为：

[0026] hemHc-P1 :5' - *GGGGCCG***Caaggaggg**atgtcaacagcagctccaaatgaa-3'，斜体表示 SacII 酶切位点序列，方框中的序列是加入的增强翻译能力的 RBS 序列；

[0027] hemHc-P2 :5' - *GGGGCCG***Cc**tatatccaaccttgaagttcacgta-3'，斜体表示 SacII 酶切位点序列；

[0028] lba 基因的特异性引物为：

[0029] lba-P1 :5' -c *gag ct***Caaggaggg**ttatgcttttttaatagctgctgc-3'，斜体表示 SmaI 酶切位点序列，方框中的序列是加入的增强翻译能力的 RBS 序列；

[0030] lba-P2 :5' -tcc *ccc ggg*atggttgcttttactgaaaaacaa-3'，斜体表示 SacI 酶切位点序列；

[0031] (4) 莱茵衣藻叶绿体表达载体的构建：

[0032] A、将步骤 (3) PCR 扩增并纯化回收的 hemHc 基因片段和 lba 基因片段分别用限制性内切酶 SacII 酶切和用 SmaI 和 SacI 酶切；将纯化的 lba 基因片段通过上述酶切位点用 T4 DNA 连接酶连接质粒 cg401-1 中的 aadA 基因之后，形成 aadA-lba 融合基因，得到载体 cg401-1-lba；用 SacII 酶切位点将 hemHc 基因用 T4DNA 连接酶连入到质粒 cg401-1-lba 中 aadA 基因之后和 lba 基因之前，形成 aadA-hemHc-lba 融合蛋白，构建得到衣藻叶绿体表达载体 cg401-1-hemHc-lba；转化大肠杆菌 DH5 α，用于保存、鉴定和大量制备质粒 DNA；

[0033] (4) 莱茵衣藻叶绿体的转化：

[0034] A、取 100ml 对数期中后期的莱茵衣藻，25℃，3000rpm 离心 5min 收集藻细胞，用新鲜 TAP 洗三次，涂于新鲜 TAP 固体平板上；光照 100 微摩尔光量子 / 平方米 · 秒，25±1℃ 条件下培养 24 小时；基因枪轰击转化；真空度 9.48192×10⁴Pa，轰击距离 9cm，氦气压力 7.584236×10⁶Pa，金粉子弹经限制性内切酶 EcoRI 酶切质粒 cg401-1-hemHc-lba DNA 包裹，金粉子弹颗粒直径 1.0 微米；

[0035] B、转化后的衣藻在光照和 25±1℃ 条件下，过渡培养 18h，用 TAP 液体培养基冲洗，

涂布于含壮观霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 TAP 固体选择培养基上, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 100 微摩尔光子 / 平方米 · 秒连续光照, 培养约 7 ~ 15 天; 取有抗性的单藻落分别在选择培养基上多次继代培养; 分别进行产氢培养, 并检测产氢量和耗氧量;

[0036] (5) 分析转基因莱茵衣藻中 hemHc-1bac 基因的整合及其表达:

[0037] A、hemHc-1bac 基因整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA 的检测:

[0038] a、hemHc 基因和 1bac 基因同源重组交换整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA, 以转基因衣藻总 DNA 为模板的 PCR 产物为 5254bp; 未整合的 PCR 产物是 3732bp; 与莱茵衣藻叶绿体 DNA 结合的引物是 cpDNA-P1 :5'

[0039] -aacatgctaagttttacaagccccgaag-3'; cpDNA-P2 :5'

[0040] -gtctttatgagccgctccccgaag-3';

[0041] b、取对数生长后期的衣藻培养液, 4°C 低速离心收集, 加 350 μl DNA 提取液: 0.1mol/L 氯化钠, 50mmol/L 乙二胺四乙酸, 20mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸, pH 8.0, 重悬沉淀; 加入 25 μl 10mg/ml 的蛋白酶 K 及 25 μl 20% 十二烷基硫酸钠, 混匀 37°C 水浴 12 小时, 冰上冷却; 加入 200 μl 5mol/L 醋酸钾, 静置离心; 上清液中加入等体积 25 : 24 : 1 的酚 / 氯仿 / 异戊醇溶液抽提 2 次, 再用等体积的氯仿抽提 1 次, 总 DNA 用无水乙醇沉淀和 70% 乙醇洗涤, 干燥后溶于 30 μl 三羟甲基氨基甲烷 - 乙二胺四乙酸缓冲液;

[0042] B、转基因莱茵衣藻中 hemHc 基因和 1bac 基因转录的检测:

[0043] 取对数生长期中期的莱茵衣藻, 室温 3000rpm 离心 5 分钟收集藻细胞, 提取总 RNA, 反转录 cDNA; 利用 hemHc 基因和 1bac 基因的特异性引物和扩增 hemHc 基因和 1bac 基因所述的 PCR 条件扩增, 进行 hemHc 基因和 1bac 基因转录水平的检测;

[0044] C、转基因莱茵衣藻中重组蛋白 hemH 和 Lba 表达量的检测:

[0045] a、按下列配比制备蛋白提取缓冲液: 50mM 三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸 pH 8.3 含 1% 曲拉通; 上样缓冲液: 0.25M 三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸, pH 8.0; 25% 甘油; 7.5% 十二烷基硫酸钠; 0.25mg ml^{-1} 溴酚兰; 12.5% (v/v) β -巯基乙醇;

[0046] b、取产氢培养的莱茵衣藻培养液, 室温, 3000rpm 离心 5min 收集藻细胞, 用 250 μl 蛋白提取缓冲液悬浮, 加入 2 μl β -巯基乙醇, 液氮冻融三次; 4°C 条件下离心 20min; 取 200 μl 蛋白上清液加入 100 μl 上样缓冲液, 用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行凝胶电泳, 转聚偏氟乙烯膜; 分别用抗 hemH 多克隆抗体和抗 Lba 多克隆抗体做免疫杂交检测, 再对 HRP 标记的抗体进行化学发光检测;

[0047] (6) 分析重组豆血红蛋白 hemH-Lba 对莱茵衣藻生长的影响:

[0048] A、双光束紫外可见光分光光度计检测莱茵衣藻在 750nm 处的吸光度;

[0049] B、取藻液 3000rpm 离心 5min 收集藻细胞, 加入同体积的 95% 乙醇溶液, 混合均匀, 室温避光放置 20min, 4°C , 12000rpm 离心 10min; 取上清, 测定 665 纳米吸光度值及 649 纳米吸光度值的吸光值;

[0050] C、计算总叶绿素的含量, 单位 mg/L:

[0051] 叶绿素 Chl mg/L = $20.04 \times OD_{649} + 6.10 \times OD_{665}$;

[0052] (7) 分析重组豆血红蛋白 hemH-Lba 对莱茵衣藻产氢培养的耗氧量和产氢量的影响:

[0053] A、黑暗呼吸耗氧和缺硫培养基中耗氧量以及产氢量的检测:

[0054] B、快速充氩气耗氧和缺硫培养基中产氢量的检测。

[0055] 所述的优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法，TAP 培养基为三羟甲基氨基甲烷 - 乙酸 - 磷酸盐培养基。

[0056] 本发明的要点是对豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemH 和球蛋白亚基基因 lba 表达的密码子按莱茵衣藻叶绿体基因密码的 A、U 偏向性进行修改，并在外源基因表达和莱茵衣藻产氢中的应用及其实施方法。

[0057] 本发明证明了密码子优化后的豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemHc 和球蛋白亚基基因 lba 在莱茵衣藻的叶绿体中表达以后，重组蛋白 hemH-Lba 的表达量提高了 6.8 倍，使转基因莱茵衣藻产氢培养体系中的氧气含量快速降低，并维持在较低的氧气含量水平，使产氢量进一步提高了 22%，总产氢量比未转基因的莱茵衣藻提高了约 4.9 倍左右。这种结果及其用途是人们在外源基因表达调控和生物制氢领域一直寻求和难以做到的。

[0058] 本发明提供了一个在莱茵衣藻叶绿体中表达的密码子优化的豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemHc 和球蛋白亚基基因 lba 的转基因莱茵衣藻。

[0059] 按照本发明，叶绿体中表达了密码子优化的豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemHc 和球蛋白亚基基因 lba 的转基因莱茵衣藻，其外源重组蛋白 hemH 和 Lba 的表达量明显提高，其产氢培养体系中氧气含量明显降低，产氢量明显提高。

[0060] 在本发明中，密码子优化的 hemHc 基因和 lba 基因分别是根据慢生大豆根瘤菌的亚铁整合酶基因 hemH 和大豆血红蛋白球蛋白亚基基因 lba 进行密码子优化的，它们的原始核苷酸序列和氨基酸序列是已知的，其基因库 (NCBI GenBank) 序列号分别是 M92427 和 V00453。本领域的技术人员可以通过该基因序列中的数据信息进行检索得到该 hemH 和 lba 基因的信息。本发明优选具有该序列号信息所示的核苷酸序列，更优选的是编码具有该序列号信息所示的氨基酸序列的基因。在本发明的具体实例中，特别提到的密码子优化的豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemHc 和球蛋白亚基基因 lba 是根据慢生大豆根瘤菌的亚铁整合酶基因 hemH 和大豆血红蛋白球蛋白亚基基因 lba 的原始核苷酸序列进行密码子优化后分别合成于生物公司，本发明的具体实例中是合成于上海生工公司。可选择地、利用已有的含有该基因的质粒中提取该目的基因。

[0061] 在本发明中，表达载体除了上面特别提到的密码子优化的豆血红蛋白 hemHc 基因和 lba 基因，还包括启动子、终止子，选择性标记基因、增加转录和表达稳定性的基因片段以及能够使目的基因整合到宿主细胞 DNA 上并稳定表达的基因片段等，这些都是在植物和藻类转基因工作中常用的基因表达元件。在本发明的具体实例中，用于豆血红蛋白 hemHc 基因和 lba 基因的表达载体包括 psbB 启动子和终止子、3' -rbcL 转录稳定性增强元件、aadA 筛选性标记基因和帮助该表达载体整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA 上的含 atpB 基因序列的 cpDNA-1 序列区域和 cpDNA-2 序列区域。

[0062] 本发明提供的启动子、终止子、增加转录稳定性的基因片段和帮助目的基因整合到叶绿体 DNA 上的基因片段的种类不受限制，只要能够在 hemHc 基因和 lba 基因导入并整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA 上并能将该基因稳定表达就可以。优选是 psbB 启动子和终止子、3' -rbcL 基因序列以及含 atpB 基因序列的基因序列片段等莱茵衣藻叶绿体内源基因表达调控元件。

[0063] 本发明指的转化包括基因枪转化法和电击转化法，更优选的是基因枪转化法。在

利于表达载体导入的条件下,用包被表达载体 DNA 的金粉轰击衣藻细胞,将含有包括密码子优化的豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemHc 和球蛋白亚基基因 lba 的表达载体导入莱茵衣藻细胞的叶绿体中。

[0064] 本发明通过抗生素的选择性筛选出表达豆血红蛋白亚铁整合酶 hemH 和 Lba 的转基因莱茵衣藻,并进一步在抗生素平板上多次继代培养,增加目的基因在转基因莱茵衣藻叶绿体 DNA 中的整合率;筛选出重组蛋白 hemH-Lba 表达量高和产氢培养体系中氧气含量低、产氢量高的转基因莱茵衣藻单克隆。

[0065] 本发明表达理解为将起始 DNA 或 RNA 的遗传信息转移至基因产物多肽或蛋白质中,即本发明中的豆血红蛋白亚铁整合酶和球蛋白亚基。

[0066] 本发明转基因理解为将遗传信息转移至生物体,特别是莱茵衣藻。这意味着包括引入所有对熟练工作人员所公知信息的方法,例如粒子轰击、电穿孔、化学介导或农杆菌介导的摄入、显微注射等。遗传信息可引入细胞,例如以 DNA、RNA、质粒或以任何其它方式,并且通过重组掺入宿主基因组的方式。为了本发明目的顺利实现,转基因莱茵衣藻是经过遗传修饰的莱茵衣藻。

[0067] 本发明通过按照莱茵衣藻叶绿体基因密码子 A、U 偏向性来优化豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemH 和球蛋白亚基 lba 基因的密码子,使其在莱茵衣藻叶绿体中表达,提高外源重组蛋白 hemH-Lba 的表达量和使转基因莱茵衣藻的产氢能力提高。

[0068] 本发明所述的在其叶绿体中表达密码子优化的豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemHc 和球蛋白亚基 lba 基因的转基因莱茵衣藻,其分类命名为莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)cg401-1-hemHc-lba。

[0069] 本发明所述的转基因莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)cg401-1-hemHc-lba,其细胞总可溶性蛋白中外源重组蛋白 hemH-Lba 的表达量明显增加。

[0070] 本发明所述的转基因莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)cg401-1-hemHc-lba,其密闭培养体系中的氧气含量下降地明显比未转基因莱茵衣藻和未优化密码子的转基因莱茵衣藻的快,并且氧气含量能维持较低水平,产氢量明显增加。

[0071] 本发明所述的方法也适用于包括莱茵衣藻在内的其它微型绿藻的外源基因表达调控和产氢能力的提高。

[0072] 本发明的创造性在于世界上首次通过修改密码偏向性使豆血红蛋白基因在莱茵衣藻叶绿体中的表达量显著提高;首次在这个世界上提供了按照莱茵衣藻叶绿体基因表达的密码偏向性修改豆血红蛋白基因 hemH 和 lba 密码子的模式和方法;首次提供了一个在叶绿体中表达豆血红蛋白 hemHc 基因和 lba 基因和增加产氢量的转基因莱茵衣藻藻种。

[0073] 本发明目的生物体是具有更多密码偏性的物种,如具有光合活性的产氢微藻和需要呼吸提供能量产氢的微藻或微生物,优选的藻类是莱茵衣藻。

[0074] 本发明目的基因是具有更多医药、生物能源、环境保护等特殊用途的外源基因。

[0075] 本发明首次对豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemH 和球蛋白亚基基因 lba 的密码子按照莱茵衣藻叶绿体基因表达的密码子 A、U 偏向性进行优化,应用于莱茵衣藻及其它具有密码偏向性的多种产氢微藻,使得外源重组蛋白的表达量明显提高,也使产氢微藻的产氢量得到进一步提高,具有创造性和实用性。本发明方法是外源基因表达调控的成功范例;是制备人类迫切需要的清洁生物能源的基础;本发明对未来的生物技术、能源技术、环境技术

和医药技术的发展都具有重要意义。

[0076] 本发明具有如下优点：

[0077] 1、显著提高了外源重组蛋白的表达量。

[0078] 2、进一步降低绿藻产氢培养体系中氧气含量和提高生物产氢量。

[0079] 3、本发明方法适用于具有密码偏向性的更多物种的外源基因表达调控。

附图说明

[0080] 图 1 为莱茵衣藻叶绿体表达载体 cg40-1-1-hemHc-1bac 的酶切鉴定电泳图。图中：1 为分子标记 λ HindIII 图；2 为质粒 cg40-1-1-hemHc-1bacDNA；3 为质粒 cg40-1-1-hemHc-1bac DNA 经 SpeI/SacII 酶切图；4 为分子标记 DL2000。

[0081] 图 2 为叶绿体转化 hemHc-1bac 基因的莱茵衣藻在含 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 壮观霉素的 TAP 平板上筛选图。平板上 A 部分为阴性对照组，即未转基因的莱茵衣藻 cc849；B 部分为阳性对照组，即转化载体 cg40-1-1 的莱茵衣藻；C 部分为转化 hemHc-1bac 基因的莱茵衣藻。

[0082] 图 3 为莱茵衣藻叶绿体中转化 hemHc 基因和 1bac 基因的 PCR 鉴定图。图 A 为以总 DNA 为模板的 PCR 电泳图；图 B 为以 cDNA 为模板的 PCR 电泳图。

[0083] 图 4 为对叶绿体中转化 hemHc 和 1bac 基因的莱茵衣藻中 hemH-Lba 表达量进行蛋白印记杂交 (Western Blot) 检测图。图 A 为 TAP 培养基中培养样品，图 B 为在 TAP-S 培养基中且密闭培养样品。

[0084] 图 5 为叶绿体中转化 hemHc 和 1bac 基因的莱茵衣藻与未转基因莱茵衣藻 cc849 的吸光值比较图。

[0085] 图 6 为叶绿体中转化 hemHc 和 1bac 基因的莱茵衣藻与未转基因莱茵衣藻 cc849 的叶绿素浓度比较图。

[0086] 图 7 为叶绿体中转化 hemHc 和 1bac 基因的莱茵衣藻黑暗呼吸耗氧和产氢情况图。

[0087] 图 8 为叶绿体中转化 hemHc 和 1bac 基因的莱茵衣藻在缺硫培养基中充氩气快速耗氧后培养 2-18 小时与未转基因莱茵衣藻 cc849 的产氢量比较图。

[0088] 图 9 为叶绿体中转化 hemHc 和 1bac 基因的莱茵衣藻在缺硫培养基中充氩气快速耗氧后培养 1-6 天与未转基因莱茵衣藻 cc849 的产氢量比较图。

具体实施方式

[0089] 实施例 1：

[0090] 莱茵衣藻培养：

[0091] 莱茵衣藻生长速度快、培养成本低、氢化酶活性高，是微藻光合制氢的代表物种。为了使转基因容易操作，本发明优选细胞壁缺欠型的莱茵衣藻藻种 cc849。

[0092] ①莱茵衣藻正常培养条件：按照 Harris 主编的《The Chlamydomonas Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. New York: Academic Press. 1989》，优选条件 $25\pm 1^\circ\text{C}$ ，日光灯光照强度 ($100\sim 200\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)；液体培养是在 $50\sim 100\text{ml}$ Tris-Acetate-Phosphate (TAP) 培养基，初始 pH7.2，水平摇床转速 $100\sim 130\text{rpm}$ ，每 5~6 天 1% 接种继代培养；固体 TAP 平板培养基含 1.5% 的琼脂粉，藻种的保存和纯化是挑取平板上的莱茵衣藻单克隆通过划线方法接种在平板上，每 3 周继代一

次。

[0093] ② 莱茵衣藻产氢培养条件：按照 Melis 等 (Plant Physiology. 2000, 122 : 127-136) 的方法, 莱茵衣藻的产氢培养是在缺硫培养基 (TAP-S) 中进行。缺硫培养基 (TAP-S) 是把正常的 TAP 培养基的硫酸镁、硫酸铁、硫酸铜和硫酸锌分别换为等摩尔浓度的氯化镁、氯化铁、氯化铜和氯化锌。本发明为了将来在工业化生产中应用, 有目的的简化了其产氢培养的操作步骤: 即将生长至对数期后期的莱茵衣藻 3000rpm 室温离心 5min, 收集藻细胞并用 TAP-S 培养基洗 3 次, 然后悬浮在 TAP-S 或者含有不同浓度硫酸盐的 TAP-S 培养基内, 分别装在 50ml 的培养瓶内, 培养瓶上方留 10ml 的空间, 用翻口橡皮塞塞紧培养瓶密闭培养。放在黑暗条件下培养 24 小时, 然后放在连续光照条件下培养, 光照强度 $50 \sim 100 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。每 24 小时用微量气密进样器抽取瓶中气体, 进行气体成分和含量检测。

[0094] ③ 按照冉春秋等 (高等学校化学学报, 2006, 27 : 62-66.) 的方法用 GC 测定氢气和氧气含量。气相色谱仪为 Agilent Technologies GC7890A, USA, 分子筛 $5 \times 1/8$ (OD), 柱长 2m, 内径 3mm, 热导检测器 TCD, 以氩气作为载气。进样体积 0.5ml, 柱温 50°C , 进样温度 200°C , 热导检测温度 300°C 。用本领域技术人员公知的外标法计算氢气和氧气体积。

[0095] 实施例 2 :

[0096] 豆血红蛋白 hemH 基因和 lba 基因的密码子优化、合成和 PCR 扩增 :

[0097] 从 GenBank 中调取序列号为 M92427 的慢生大豆根瘤菌 hemH 基因序列和序列号为 V00453 的大豆 lba 基因序列 ;

[0098] 莱茵衣藻叶绿体基因表达的密码子具有明显的腺嘌呤 (A) 和尿嘧啶 (U) 偏向性, 尤其是密码子的第三位碱基具有明显的 A、U 偏向性。按照编码氨基酸密码子的兼并性和在不改变原有基因氨基酸序列的前提下, 分别对豆血红蛋白 hemH 基因和 lba 基因的密码子进行修改, 将原密码子对应的 DNA 核苷酸序列中、尤其是密码子的第三位碱基对应的 DNA 核苷酸序列中原来的鸟嘌呤 (G) 或胞嘧啶 (C) 改为腺嘌呤 (A) 或胸腺嘧啶 (T), 如附件 1 和附件 2 所示。分别将优化后的基因命名为 hemHc 和 lbac, 且分别在 hemHc 基因的 5' 端和 3' 端加上限制性内切酶 SacII 的酶切位点序列, 在 lbac 基因的 5' 端和 3' 端加上限制性内切酶 Sma I 和 Sac I 的酶切位点序列。

[0099] 分别将上述优化后的 hemHc 基因和 lbac 基因的核苷酸序列以及添加的相应的限制性内切酶酶切位点核苷酸序列送上海生工公司进行核苷酸序列合成。

[0100] hemHc 基因和 lbac 基因的扩增 :

[0101] 以上述合成的 hemHc 基因和 lbac 基因核苷酸序列为模板, 进行聚合酶链式反应 PCR 扩增相应的 hemHc 基因和 lbac 基因, 反应条件为 : 94°C 预变性 5min, 一个循环 ; 94°C 变性 30s, 58°C (hemHc) 或 59°C (lbac) 退火 30s, 72°C 延伸 1.5min ; 共 30 个循环 ; 72°C 延伸 15min ; 反应产物纯化回收, 用于测序鉴定和下一步莱茵衣藻叶绿体转化载体的构建 ;

[0102] 用于 PCR 扩增、测序鉴定以及 hemHc 基因和 lbac 基因转录表达检测的特异性引物 :

[0103] hemHc 基因的特异性引物为 :

[0104] hemHc-P1 : $5'$ - *GGGCCC* *gaggagg* *atgtcaacagcagctccaaatgaa-3'*, 斜体表示

SacII 酶切位点序列,方框中的序列是加入的增强翻译能力的 RBS 序列;

[0105] hemHc-P2 :5'-***GCGGCCGC*** tatatccaaccttgaagttcacgta-3',斜体表示 SacII 酶切位点序列。

[0106] lbac 基因的特异性引物为:

[0107] Lbac-P1 :5'-c ***gag ct******agggagg*** ttatgcttttttaatagctgctgc-3',斜体表示 SmaI 酶切位点序列,方框中的序列是加入的增强翻译能力的 RBS 序列;

[0108] Lbac-P2 :5'-tcc ***ccc ggg*** atggttgcttttactgaaaaacaa-3',斜体表示 SacI 酶切位点序列。

[0109] 实施例 3:

[0110] 莱茵衣藻叶绿体表达载体的构建:

[0111] 通过本领域熟练技术人员所公知的标准方法 (Sambrook 等, MolecularCloning. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press.1998) 和 Vaistij 等对莱茵衣藻叶绿体表达载体 cg40 描述的方法 (The PlantJournal,2000,21(5) :469-482) 进行载体构建。分别用限制性内切酶 SmaI 和 SacI 酶切上述克隆得到的 lbac 基因片段和载体 cg401-1,将纯化的 lbac 基因片段通过上述两个酶切位点用 T4 DNA 连接酶连接在质粒 cg401-1 中的 aadA 基因之后形成 aadA-lbac 融合基因,得到载体 cg401-1-lbac,再用 SacII 酶切位点将 hemHc 基因用 T4DNA 连接酶连入到质粒 cg401-1-lbac 中 aadA 基因之后和 lbac 基因之前,形成 aadA-hemHc-lbac 融合蛋白,构建得到衣藻叶绿体表达载体 cg401-1-hemHc-lbac,转化大肠杆菌 DH5 α ,用于保存、鉴定和大量制备质粒 DNA,图 1。

[0112] 实施例 4:

[0113] 莱茵衣藻叶绿体的转化:

[0114] 通过 Boynton 等 (Science,1988,240(4858) :1534-1538) 的方法对莱茵衣藻叶绿体进行转化。取 100ml 生长至对数期中后期 (约 $4-5 \times 10^6$) 的莱茵衣藻,25℃下 3000rpm 离心 5min 收集藻细胞,用新鲜 TAP 洗三次,涂于新鲜 TAP 固体平板上,在光照 $100 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 $25 \pm 1^\circ \text{C}$ 条件下培养 1 天,用基因枪 (BioRad®, Model :PDS1000/He Biolistic particledelivery system) 进行轰击转化。参数为 :真空度 $9.48192 \times 10^4 \text{Pa}$,轰击距离 9cm,氦气压力 $7.584236 \times 10^6 \text{Pa}$,金粉颗粒直径 $1.0 \mu \text{m}$ 。金粉子弹用经 EcoRI 酶切的线性化质粒 cg401-1-hemHc-lbac DNA 包裹。

[0115] 转化后的衣藻在 25℃和光照下经过 18h 过渡培养后,用 TAP 液体培养基冲洗,涂布于含壮观霉素 $100 \mu \text{g/ml}$ 的 TAP 固体选择培养基上,在 25℃和 $100 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的连续光照条件下,培养 7-15 天,挑取有抗性的单藻落分别在选择培养基上多次继代培养,见图 2 中 C。然后分别进行产氢培养并检测产氢量和耗氧量,使用上海基量标准气体有限公司生产的标准品定义所测气体的组成和含量。

[0116] 实施例 5:

[0117] 分析转基因莱茵衣藻中 hemHc-lbac 基因的整合及其表达:

[0118] ① hemHc-lbac 基因整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA 的检测:

[0119] 测定 hemHc-lbac 基因整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA 的合适方法是实施下文所述的 PCR 法,如果 hemHc 基因和 lbac 基因通过同源重组交换的方式整合到莱茵衣藻叶绿体 DNA

上,则以转基因衣藻总 DNA 为模板的 PCR 产物应该是 5254bp,而未整合的 PCR 产物应该是 3732bp,图 3A。其中与莱茵衣藻叶绿体 DNA 结合的引物是 cpDNA-P1 :5' -aacatgctaagttta caagcccgaag-3' ;cpDNA-P2 :5' -gtctttatgagccgtccccgaag-3'。

[0120] 通过 Rochaix 和 Erickson 的方法 (Trends in Biochemistry Science,1988,13 : 56-59) 提取衣藻总 DNA。取 10ml 处于对数生长后期的衣藻培养液,4℃低速离心收集,加 350 μ l NET(0.1mo l/L NaCl,50mmol/L EDTA,20mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 重悬沉淀,加入 25 μ l 10mg/ml 的蛋白酶 K(Proteinase K) 及 25 μ l 20% SDS,混匀并于 37℃水浴过夜,冰上冷却,加入 200 μ l 5mol/L KAc,冰上静置后离心,上清液中加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1) 抽提 2 次,再用等体积的氯仿抽提 1 次,总 DNA 用无水乙醇沉淀和 70% 乙醇洗涤,干燥后溶于 30 μ l TE 缓冲液,用于上述 PCR 检测。

[0121] ②转基因莱茵衣藻中 hemHc 基因和 lba 基因转录的检测 :

[0122] 检测 hemHc 基因和 lba 基因在转基因莱茵衣藻中是否转录的合适方法是按照本领域熟练技术人员所公知的反转录 PCR 的标准方法 (Sambrook 等,Molecular Cloning. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998) 或参照上述的 hemHc 基因和 lba 基因 PCR 扩增方法的实施部分。莱茵衣藻的取样是取对数生长期中期的莱茵衣藻 1ml 左右,室温 3000rpm 离心 5 分钟收集藻细胞。按照试剂盒制造商的产品说明书 (QIAGEN, Promega) 提取莱茵衣藻的总 RNA 和按照 Promega AMV RT Protocol 说明书合成 cDNA,利用上述 hemHc 基因和 lba 基因的特异性引物和所述的 PCR 条件进行扩增,进行 hemHc 基因和 lba 基因转录水平的检测,图 3B。分别扩增到一条 1000bp 左右的片断和一条 148bp 左右的片断,将 PCR 产物回收纯化,送基因测序公司证明所得核苷酸序列正确。

[0123] ③转基因莱茵衣藻中重组蛋白 hemH-lba 表达量的检测 :

[0124] 参照 Hemschemeier 等 (Planta, 2008, 227 :397-407) 的方法提取莱茵衣藻总蛋白和进行 Western blot 检测。取 30ml 进行产氢培养的莱茵衣藻培养液,快速室温 3000rpm 离心 5min 收集藻细胞。用 250 μ l 蛋白提取缓冲液 (50mM Tris/HCl pH 8.3,1% Triton-X 100) 悬浮,加入 2 μ l β - 巯基乙醇,液氮冻融三次 ;在 4℃,14000g 离心 20min,取 100 μ g 的蛋白上清液加上样缓冲液 (0.25M Tris-HCl, pH 8.0 ;25% glycerol ;7.5% SDS ;0.25mg ml⁻¹ bromophenolblue ;12.5% (v/v) 2-mercaptoethanol) 于 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转 PVDF 膜 (Millipore, USA),一抗分别用抗 hemH 多克隆抗体和抗大豆 Lba 多克隆抗体 (上海中科蛋白抗体制备公司) 进行免疫杂交检测,按照 ECL Plus (Amersham 公司) 说明书对 HRP 标记的抗体进行化学发光检测,见图 4。结果表明,无论在正常培养条件下 (图 4, A) 还是在缺硫无氧的产氢条件下 (图 4, B),重组蛋白 hemH-Lba 的表达量都提高了 6.8 倍。而且产氢培养条件下,重组蛋白 hemH-Lba 的最大表达量出现在产氢培养的第 5 天,这个时间与转基因衣藻的最大产氢速率出现的时间一致,说明重组 hemH-Lba 对转基因莱茵衣藻的耗氧和产氢产生影响。

[0125] 对于蛋白质的定量和 SDS-PAGE 凝胶电泳以及 western blot 实验中的转膜、封闭、杂交、洗膜、显影等操作技术均为本领域熟练技术人员所公知的标准方法 (Sambrook 等, Molecular Cloning. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998) 或按照试剂盒制造商说明书 (Bio-Rad Bradford kit 和 GE Healthcare) 操作。

[0126] 实施例 6 :

[0127] 分析重组豆血红蛋白 hemH-Lba 基因对莱茵衣藻生长的影响：

[0128] 本发明通过测量转基因藻前后莱茵衣藻的细胞数和叶绿素含量的变化来比较在叶绿体中表达豆血红蛋白亚铁螯合酶和球蛋白亚基 Lba 对莱茵衣藻生物量的影响。藻细胞数和叶绿素含量的测定参照 Harris 主编的《The Chlamydomonas Sourcebook : a comprehensive guide to biology and laboratory use. New York : Academic Press. 1989》方法。莱茵衣藻在 750nm 处的吸光度 (OD_{750}) 与莱茵衣藻的细胞数正相关,用 TU-1901 双光束紫外可见光光度计直接检测培养的莱茵衣藻在 750nm 处的吸光度作为莱茵衣藻细胞数的生长指标。叶绿素含量的测定是取 1ml 藻液,3000rpm 离心 5min 收集藻细胞,加入同体积的 95% 乙醇溶液,混匀,室温避光放置 20min,4℃ 下 12000rpm 离心 10min,取上清,按比例稀释后,测定 OD_{665} 及 OD_{649} 的吸光值,根据下列公式计算出总叶绿素的含量,单位是 mg/L。

[0129] 叶绿素 Chl (mg/l) = $20.04 \times (OD_{649}) + 6.10 \times (OD_{665})$ 。

[0130] 结果表明在叶绿体中表达 hemHc 基因和 lba 基因未使转基因莱茵衣藻的生长受到抑制,见图 5、图 6。

[0131] 实施例 7：

[0132] 分析重组豆血红蛋白 hemH-Lba 对莱茵衣藻产氢培养的耗氧量和产氢量的影响：

[0133] ①在黑暗呼吸耗氧的缺硫培养基中对耗氧量和产氢量的检测：

[0134] 在缺硫培养基中,莱茵衣藻 PSII 的活性受到抑制,但是呼吸作用不受影响。在密封条件下莱茵衣藻液体培养基中的氧气含量因为呼吸消耗而快速下降,致使液体培养基中出现缺氧状态,诱导莱茵衣藻氢酶表达而开始产生氢气,通过检测密封瓶子上方封存的空气中的氧气和氢气含量变化情况就能反映出莱茵衣藻的耗氧和产氢情况,图 7。结果表明转 hemHc-lba 基因的莱茵衣藻的培养体系氧气消耗量和氢气产量都比未转基因衣藻 cc849 和转未优化 hemH-lba 基因的要高。转 hemHc-lba 基因的氧气含量由最初黑暗处理后一天的 5.2% 下降到产氢培养第六天的 2.1%,而转未优化 hemH-lba 基因衣藻的由 6.5% 下降到 3.1%,未转基因衣藻 cc849 由 10.1% 下降到 4.4%。转 hemHc-lba 基因莱茵衣藻的产氢最大速率从第三天持续到第五天,约为 $23.5 \mu\text{l mg}^{-1}\text{chl h}^{-1}$,比转未优化 hemH-lba 基因衣藻在第四和五天的最高速率 $22.0 \mu\text{l mg}^{-1}\text{chl h}^{-1}$ 要高,比未转基因衣藻 cc849 的 $4.0 \mu\text{l mg}^{-1}\text{chl h}^{-1}$ 更高。同时氢气的积累量是 hemHc-lba 基因莱茵衣藻为 2.2ml 每瓶,转未优化 hemH-lba 基因衣藻为 1.8ml 每瓶,而未转基因 cc849 仅为 0.4ml 每瓶,图 7。

[0135] ②在充氩气快速耗氧的缺硫培养基中对产氢量的影响：

[0136] 为消除黑暗呼吸耗氧诱导产氢方法中残留氧气对衣藻产氢能力的影响,本实验使用了对缺硫培养基中的莱茵衣藻培养体系快速充高纯氩气 10 分钟的方法,使培养体系内的氧气被快速排除掉,迅速诱导莱茵衣藻产氢,并比较密码子优化前后的转基因莱茵衣藻与未转基因莱茵衣藻 cc849 的产氢量之差别,图 8、图 9。本发明的结果表明在充氩气后的两个小时,转密码子优化后 hemHc-lba 的莱茵衣藻首先检测到了氢气的产生,产量为 $2.8 \mu\text{l}$,而转未优化 hemH-lba 的藻株和未转基因衣藻 cc849 都没有检测到氢气的产生。冲氩气后四天,转密码子优化后 hemHc-lba 基因的衣藻氢气积累量达到稳定水平为 2.6ml 每瓶,转未优化 hemH-lba 的藻株为 1.7ml 每瓶,未转基因衣藻 cc849 仅为 0.25ml 每瓶。

[0137] 本发明前期工作结果显示,单独在莱茵衣藻的叶绿体中表达豆血红蛋白的球蛋白亚基基因 lba 可以降低培养体系内的氧气含量和使产氢量提高约 50%;在莱茵衣藻叶绿体

中表达合成豆血红蛋白血红素辅基的 hemH 基因和球蛋白亚基基因 lba 能进一步加快莱茵衣藻产氢培养体系的氧气消耗速度和提高莱茵衣藻的氢气产量达 4 倍多。本发明的上述结果表明,在莱茵衣藻叶绿体中表达密码子优化的 hemHc 基因和 lbac 基因能进一步加快莱茵衣藻产氢培养体系的氧气消耗速度和提高莱茵衣藻的氢气产量达 4.9 倍之多,重组蛋白 hemH-Lba 在莱茵衣藻中的表达量提高 6.8 倍之多,说明密码子优化能显著提高外源基因在莱茵衣藻叶绿体中的表达量,也使转基因莱茵衣藻中的耗氧量和产氢量进一步提高,本发明方法可以用于进一步提高微型绿藻或其它物种的外源基表达和产氢能力提高。

[0138] 上述实施例仅为本发明的优选例,并不用来限制本发明,凡在本发明的原则之内,所做的任何修改和变化,均在本发明的保护范围之内。

[0139] 附件 1 为豆血红蛋白亚铁整合酶基因 hemH 密码子优化前后的比较。hemH 指是密码子优化前 ;hemHc 是指密码子优化后。

[0140] 附件 2 为豆血红蛋白球蛋白亚基基因 lba 密码子优化前后的比较。Lba 指是密码子优化前 ;lbac 是指密码子优化后。

[0141] 附件 1 :

[0142]

hemH ATGTCGACCGCGCTCCCAACGAGAACACACAGCCACCGGTCGGTCCGGCCAGGACCG 60
hemHc ATGTCACACGCGCTCCCAATGAAACAACACACCCACAGTTCGATCGGACAAAACCGT 60
M S T A A P N E T T Q P T V R S G Q K R
hemH GTTGGCGTCTCTGTCAATCTGGACGCGGATACGGCCGATCGCCGGGGTGCGG 120
hemHc GTTGGTGTCTCTGTAAATCTAGGAACCTCCGATACAGCTGATCGACCTGGAGTTCGT 120
V G V L L V N L G T P D T A D A P G V R
hemH GTCATCTCAAGGAATTCCTCTCCGACGCCGGGTCATCGAGACCCAGGGCTGGTCTGG 180
hemHc CTATATCTAAAAGAAATTCCTTCTGATGCAAGATTAATTGAAGATCAAGGCTAGTTCGG 180
V Y L K E F L S D A R V I E D Q G L V W
hemH AAGGTGGTCTAACGGGATCATCTGCGCAGCCGTCCCGCAGCAAGGCGCTCGACTAC 240
hemHc AAAGTAGTCTAAATGGNATAATACTCTGATGCTCTCGAGTAAAGCTCTGATTAT 240
K V V L N G I I L R S R P R S K A L D Y
hemH CAGAAGATCTGGAAACAGGAGAAAGAACGAGTCGCGCTGAAGACCATACGCGCTGCAA 300
hemHc CAAAATTTGGAAATAGAAAATAAGATCTCCTCTAAAACCTATTACAAGATCTCAA 300
Q K I W N N E K N E S P L K T I T R S Q
hemH AGCGAQAACCTGCGCCCGCTCTGATCGGATCATGCTCTGCTGACCTGCGCATG 360
hemHc AGTGAATAACCTGCTGCACTATCTGATCGGATCATGCTCTGCTGATGCGCTATG 360
S D K L A A A L S D R D H V V V D W A M
hemH CGGTACGGCAATCCCTCGATCAAGTCGGCATCGACGGCTGATCGCGAGCGATGCGAC 420
hemHc CGATATGGAAATCCCTCTATAAATCTGGAAATGATGCACTATAGCTGAAGGATGCTGAT 420
R Y G N P S I K S G I D A L I A E G C D
hemH CGCATCTCGCGGTCGCGCTTTATCCGCAATATTCGCCCTCGAOCCTCGGCGACGCTCTCG 480
hemHc CGTATACTAGCGTTCCTCTTTATCCCAATATTCGCTTCACCTTCGCAACTGTTTGT 480
R I L A V P L Y P Q Y S A S T S A T V C
hemH GACGAGGTGTTCCGCTGCTCGCCCGCTGCGTGGCAGCCGAGCTGCGGCTGAGCCG 540
hemHc GATGAAATTTTCGAGTACTAGCTCGTCTTCGTCGACCAACCACTCTACGAGTACTCCA 540
D E V F R V L A R L R A Q P T L R V T P
hemH CCGTACTACAGCACGAGCCCTATATCGAGCCCTGCCGCTCTCGATGAGACCCATCTG 600
hemHc CCAATATAGAGATGAAGCTATATAGAACTCTTGCAGTATCTATGAAACTCATCTI 600
P Y Y E D E A Y I E A L A V S I E T H L
hemH GCACCCCTGCGTTAAAGCCGAGCTGATCTCGCTCCCTTCACGGCATGCGGAAATCC 660
hemHc GCACCTCTCCATTTAAACCAACCTIATAGTTGCTCAATTCATGCTGATGCCAAAATCT 660
A T L P F K P E L I V A S F H G M P K S
hemH TATGTGACAAAGGGGATCCCTATCAGGAGCATTTGATGCCACGACCGAGGGCGCTGCG 720
hemHc TATGTAGATAAAGGAGATCCCTATCAGAACATTTGATTTGCTACAACAGAGGCTCTTCGT 720
Y V D K G D P Y Q E H C I A T T E A L R
hemH CGCGGCTCGGCGTGACCGCATCAAAAATTGCTGCTGACCTTCAGTCCGCTTCGGCAAT 780
hemHc CGTCACTAGGAGTAGATGATCAAAAATTACTCTTACATTCARTCAAGATTTCGTAAT 780
R R L G V D A S K L L L T F Q S R F G N
hemH GACGAGTGGCTCCAGCCCTACACGACAAAGACGATGAGCGGCTCGCGAAAGAGGGCTG 840
hemHc GATGAAATGCTACAAACATAACTGATAAACAAATGAAACGACTTCTAAAGAAAGCTGTA 840
D E W L Q P Y T D K T M E R L A K E G V

hemH CGGCGCATCGCGTGGTACCGCGGTTTTCGCGGAC TGCTGAGACGCTGAGGAG 900
hemHc CGACGAAATTCCTGTACTACTCTGGTTTTCAGCAGATGCTAGAAACTCTAGAGAA 900
R R I A V V T P G F A A D C L E T L E E
hemH ATCGCCAGGAGAAATGCCAGATCTTAAAGCAGAAATGGCGCGAGCAGTTTCCGCGATC 960
hemHc ATTGCTCAGAAATGCTGAAATTTTAAACATAAATGGAGGTAACAAATTTCTGCTATI 960
I A Q E N A E I F K H N G G E Q F S A I
hemH CCTGCTCAAGACAGCAACCGGGATGAGAGTATCCGACCTGCTGCTCGCGAG 1020
hemHc CCAATCTAATGATAGTGAACCTGATGATGTAATTCGAACTTTGACTACGTTAA 1020
P C L N D S E P G M D V I R T L V L P E

hemH CTCAGGCGTGGATATAG 1038
hemHc CTTCAAGGTTGGATATAG 1038
L Q G W I

[0143] 附件 2 :

[0144]

```

iba ATGCTTGCCTTTACTGAGAAAGCAAGATGCTTTGCTGAGTAGCTTCATTGGAAGCATTCAAG 60
ibac ATGCTTGCCTTTACTGAAAACAAGATGCTTTAATTAGTAGTTCATTGGAAGCATTCAAA 60
      M V A F T E K Q D A L V S S S F E A F K
iba GCAAACTTTCCTCANTACAGCTTGTGTTCTACACTTCGATCTGGAGAAAGCACCTGCA 120
ibac GCAAACTTTCCTCANTATAGTCTTGTTTTITATCTTCAATACTTAAAAGCACCTGCA 120
      A N I P Q Y S V V F Y T S I L E K A P A
iba GCAAAAGTACTGTTTCATTTCTAGCAAATGGAGTAGACCCCACTAATCCTAAGCTCAG 180
ibac GCAAAAGATTATTTTCATTTCTAGCAAATGGAGTAGATCCTACTAATCCTAAACTTACA 180
      A K D L F S F L A N G V D P T N P K L T
iba GGCATGCTGAAAAGCTTTTTGCATTTGGTGGTACTCAGCTGGTCAACTTAAAGCAAGT 240
ibac GGCATGCTGAAAAGCTTTTTGCATTTGGTGGTACTCAGCTGGTCAACTTAAAGCAAGT 240
      G H A E K L F A L V R D S A G Q L K A S
iba GGAACAGTGTGGCTGATGCCCACTTGGTTCTGTTCAAGCCAAAAGCACTACTGAT 300
ibac GGAACAGTGTGGCTGATGCCCACTTGGTCTGTTCAAGCTCAAAAGCACTAAGTACTGAT 300
      G T V V A D A A L G S V H A Q K A V T D
iba CCTCAGTTCTGGTGTAAAGAGCACTGCTGAAACAATAAAGCAGCAGTTGGGGAC 360
ibac CCTCAATTCGTTGTTGTTAAAGAGCACTTCTTAACAATAAAGCAGCAGTTGGTTAT 360
      P Q F V V V K E A L L K T I K A A V G D
iba AAATGGAGTCAAGAGTTGAGCCGTGCTTGGGAAGTAGCCCTACGATGAATTGGCAGCAGCT 420
ibac AAATGGAGTCAAGAGTTGAGTGGTCTTGGGAAGTAGCCTATGATGAATTAGCAGCAGCT 420
      K W S D E L S R A W E V A Y D E L A A A
iba ATTAAAGAAAGCATAA 435
ibac ATTAAAAAAGCATAA 435
      I K K A

```

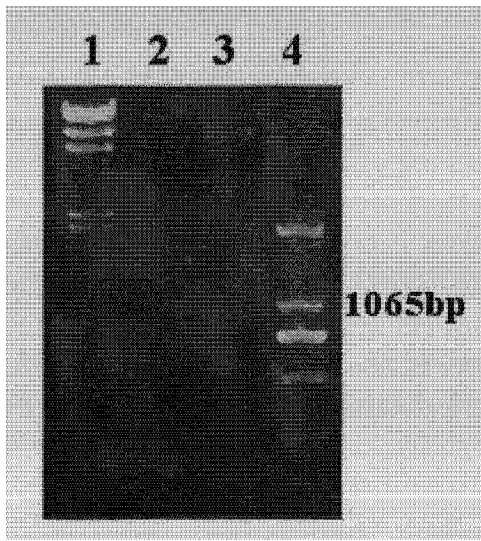


图 1

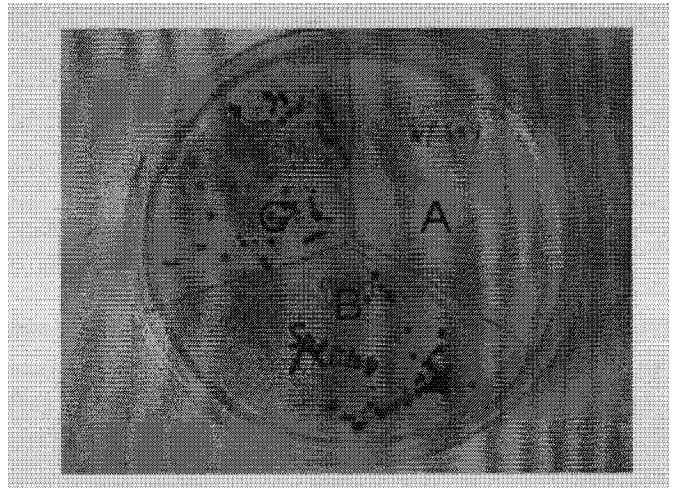


图 2

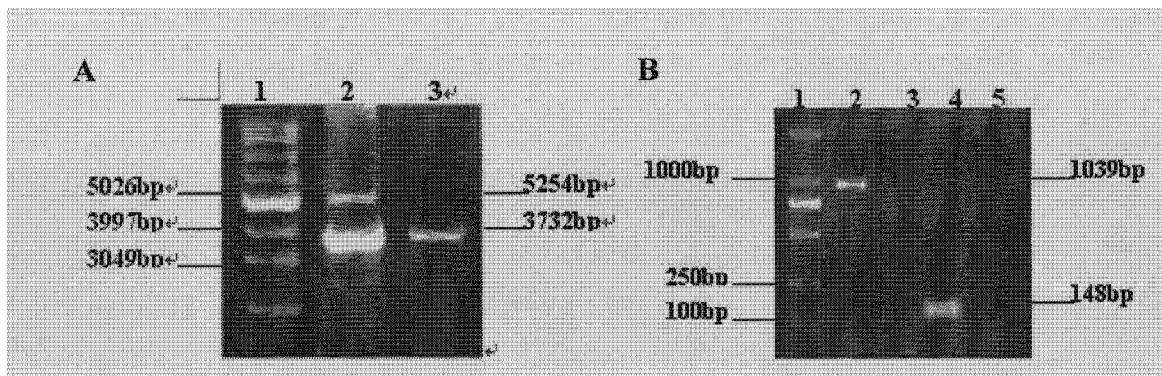


图 3

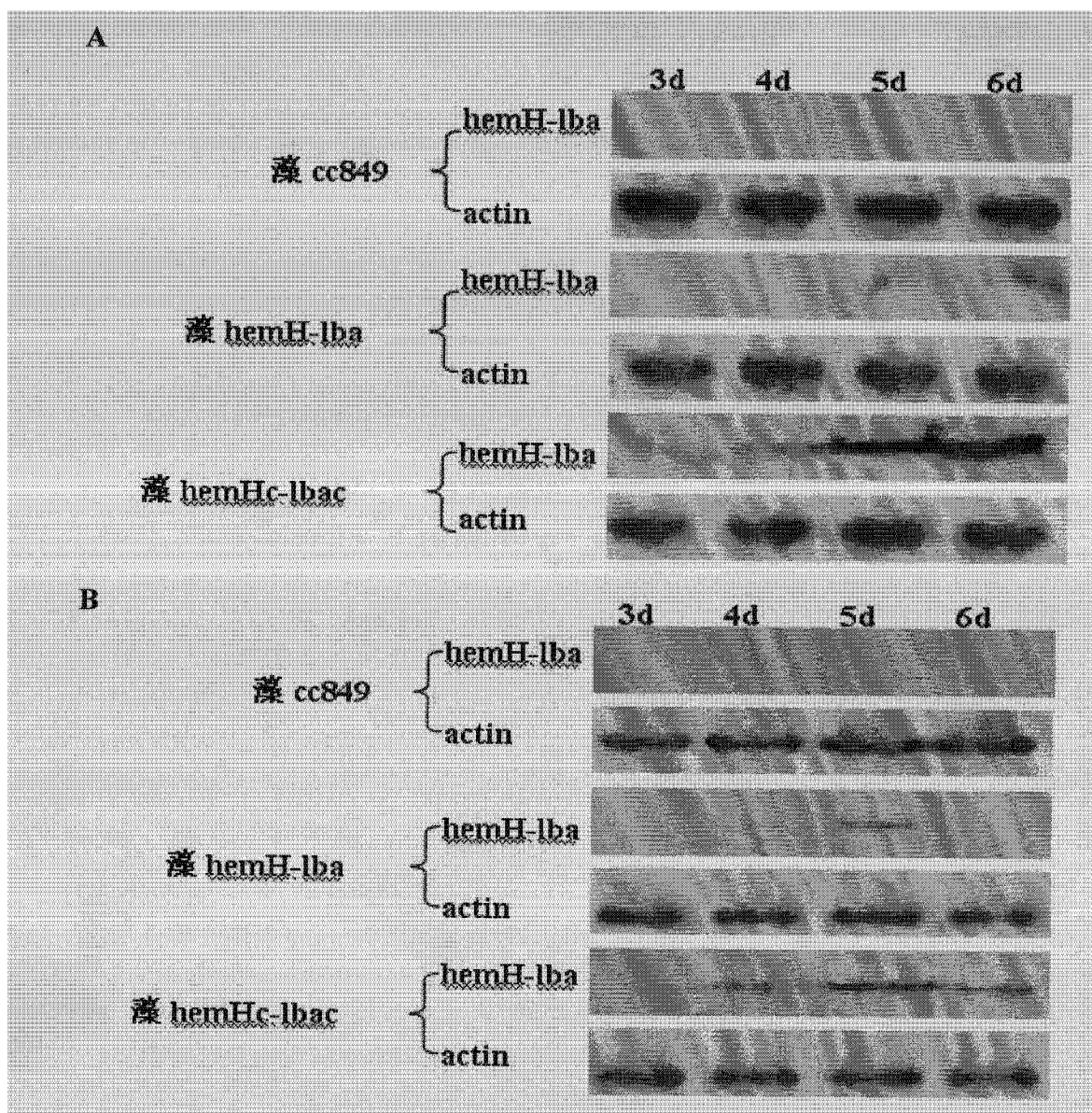


图 4

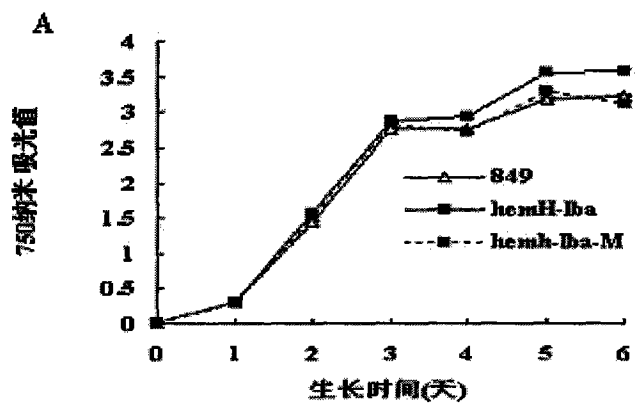


图 5

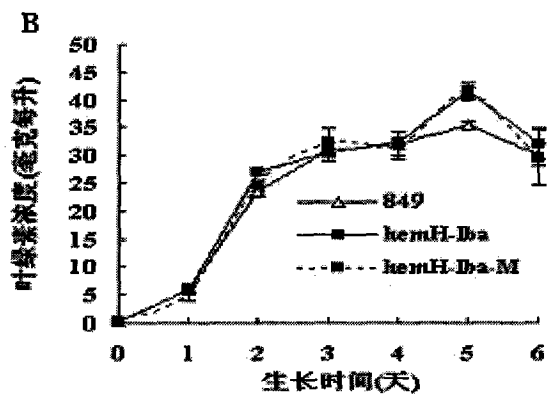


图 6

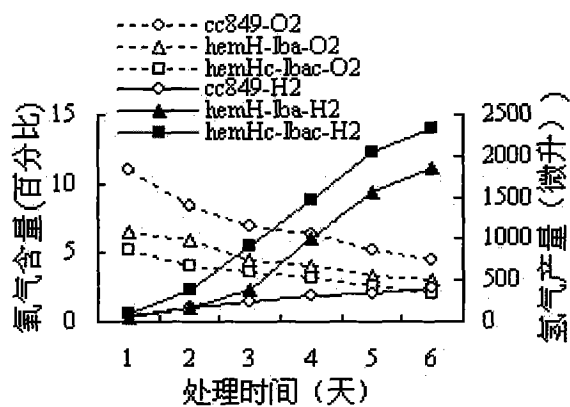


图 7

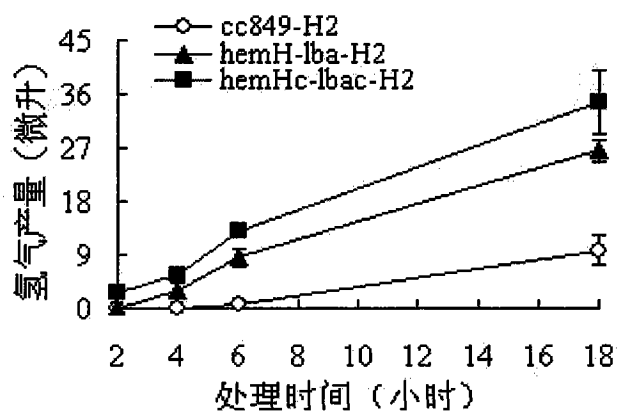


图 8

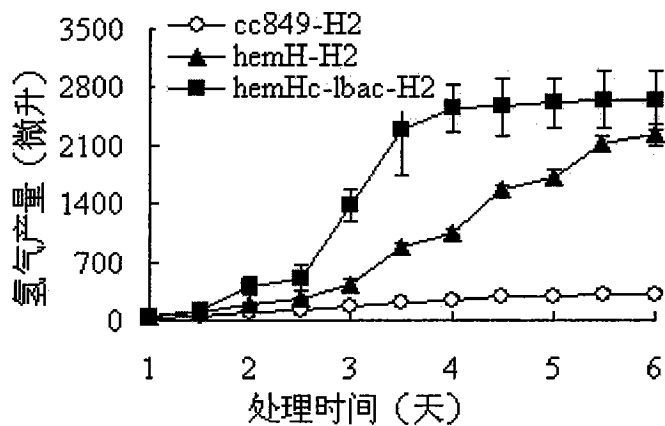


图 9

专利名称(译)	优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法		
公开(公告)号	CN102146344A	公开(公告)日	2011-08-10
申请号	CN201010528723.0	申请日	2010-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	吴双秀 许丽丽 阎光宇 黄瑞 王全喜		
发明人	吴双秀 许丽丽 阎光宇 黄瑞 王全喜		
IPC分类号	C12N15/29 G01N21/31 G01N33/53 C12P3/00 C12N15/10 C12R1/89 C12N15/52 C12N15/82 C12N1/12 C12Q1/68		
代理人(译)	杨杰民		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及外源基因表达和生物制氢技术，优化密码子提高外源基因表达量和莱茵衣藻制氢量的方法。现有技术外源豆血红蛋白基因hemH和lba在莱茵衣藻叶绿体中的表达效率低，影响莱茵衣藻产氢量的提高。本发明公开了一种对豆血红蛋白基因hemH和lba的密码子偏向性分别优化的方法，并将密码子优化后的hemHc和lba基因转入莱茵衣藻叶绿体中表达。本发明的优点是：显著提高了外源重组蛋白的表达量，外源豆血红蛋白hemH和Lba在莱茵衣藻叶绿体中的表达量提高6.8倍；莱茵衣藻产氢量比转未优化密码子的hemH和lba基因的莱茵衣藻提高22%；本发明适用于具有密码偏向性的更多物种的外源基因表达调控。

