(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120192995 A
(43)申请公布日 2025.06.24

(21)申请号 202510227764.2

(22)申请日 2025.02.28

(71)申请人 齐鲁医药学院
地址 255000 山东省淄博市周村区人民西路1678号

(72)发明人 范有鹏 龙梦飞 李晓晓 明裕程 李帅 韦磊

(74)专利代理机构 北京蓝蜘蛛专利代理有限公司 16226
专利代理师 潘显端

(51)Int.Cl.
C12N 15/75(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)
C07K 14/795(2006.01)
C12R 1/125(2006.01)

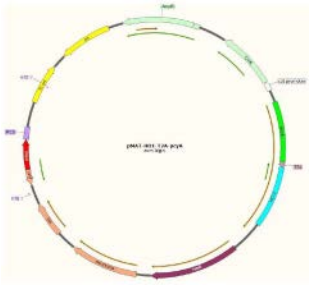
权利要求书1页 说明书5页
序列表（电子公布） 附图1页

(54)发明名称

一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法

(57)摘要

本发明涉及藻蓝素技术领域，具体公开了一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法，包括以下步骤：培养基的配制、藻蓝素生物合成关键基因的合成及载体构建、构建藻蓝素合成高效辅酶因子循环，本发明通过计算生物学，合成了一条铁氧还蛋白氧化还原酶基因PcyA的祖先序列，并采用枯草芽孢杆菌表达系统表达异源合成藻蓝素基因，且通过增加辅酶的合成，提高了藻蓝素的产量，摇瓶中达到了20.42mg/L的产量；提高了藻蓝素在芽孢杆菌表达系统中的产量，芽孢杆菌表达系统的使用为以后藻蓝素的纯化简便了内毒素去除步骤，藻蓝素提纯使用更加安全。



CN 120192995 A

1.一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1.培养基的配制:

LB培养基包括安琪酵母浸粉5g/L,蛋白胨10g/L,氯化钠10g/L,配制LB固体培养基时加入10g/L琼脂;

TB培养基包括蛋白胨12g/L,酵母提取物24g/L,甘油0.4%,磷酸二氢钾2.313g/L,所述甘油为单独高压灭菌后产物;

发酵培养基包括酵母粉10g、甘油30g,磷酸氢二钾3g/L,磷酸二氢钾1.5g/L,硫酸镁0.5g/L,硫酸铵0.35g/L,酵母浸粉0.2g/L,硫酸锰0.2g/L,硫酸亚铁0.1g/L,碳酸钙0.1g/L;

S2.藻蓝素生物合成关键基因的合成及载体构建

通过化学合成血红素加氧酶Ho1基因、铁氧还蛋白氧化还原酶基因PcyA的祖先序列以及自裂肽标签T2A,并将这些序列装入pMATE03载体,构建成功pMATE03-HO1-T2A-PcyA载体;

所述血红素加氧酶Ho1基因(YP_214522.1),核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

所述铁氧还蛋白氧化还原酶基因PcyA的祖先序列,核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

所述自裂肽标签T2A,核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示的自裂肽标签T2A;

S3.构建藻蓝素合成高效辅酶因子循环

在血红素氧化酶和铁氧还蛋白氧化还原酶的诱导下,藻蓝素成功产生,然而,血红素转变为胆绿素这一步骤是限速步骤,需要辅酶因子NADPH的参与,通过敲除枯草芽孢杆菌外膜通道蛋白Tolc并导入nad基因,加速了辅酶因子循环,增加了藻蓝素的生成。

2.根据权利要求1所述的一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法,其特征在于:所述构建成功的pMATE03-HO1-T2A-PcyA载体,通过电转方式转入表达菌株这种,获得含有HO1-T2A-PcyA基因的重组菌株。

3.根据权利要求1所述的一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法,其特征在于:所述重组菌株的培养采用LB培养基或TB培养基。

4.根据权利要求1所述的一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法,所述重组菌株使用发酵培养基进行发酵,使用麦芽糖进行诱导。

一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法

技术领域

[0001] 本发明属于藻蓝素技术领域,具体涉及一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法。

背景技术

[0002] 藻蓝素(又称藻蓝蛋白或藻胆蛋白)是一种主要存在于红藻、蓝藻等中的色素蛋白复合体,具有捕获蓝绿光的能力,并且在食品、化妆品、保健品和药品等领域具有广泛的应用。它由脱辅基蛋白和色基组成,具有荧光活性,其合成过程涉及到多个酶的作用,如胆色素原合酶、尿卟啉原III合酶等。

[0003] 目前,藻蓝素的获取方法主要采用高温甲醇分解法从螺旋藻中提取。该方法存在诸多问题:

[0004] (1)甲醇高温热解需要耗费大量的能量,造成能源浪费;

[0005] (2)螺旋藻中与藻蓝素共存的其他色素,如叶绿素、叶黄素等一系列前体,对后期产物纯化有不利影响;

[0006] (3)螺旋藻生长周期较长,限制了藻蓝素的生产效率和应用。因此,从天然藻类中提取高纯度的PCB是一项复杂且不经济的方法。

[0007] 针对此问题,江南大学赵鑫锐等人进行了关于藻蓝素合成的研究,在大肠杆菌中异源表达特定基因,并强化了血红素的合成,实现了原血红素向藻蓝素合成中间体胆绿素的转化,在5L发酵罐中实现了藻蓝素28.32mg/L的产量;江南大学周景文等人通过在大肠杆菌中异源表达特定基因,并强化了血红素的合成,实现了原血红素向藻蓝素合成中间体胆绿素的转化,减少了中间产物胆绿素的积累,通过发酵生产藻蓝素,最终产量达到147mg/L。

[0008] 以上技术的使用使藻蓝素的生物合成量提升了一个大的台阶,但是这个产量还难以满足工业化生产的需求,此外,由于采用大肠杆菌表达系统,将藻蓝素纯化后还要面临检测内毒素的问题。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0011] 一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法,包括以下步骤:

[0012] S1.培养基的配制:

[0013] LB培养基包括安琪酵母浸粉5g/L,蛋白胨10g/L,氯化钠10g/L,配制LB固体培养基时加入10g/L琼脂;

[0014] TB培养基包括蛋白胨12g/L,酵母提取物24g/L,甘油0.4%,磷酸二氢钾2.313g/L,所述甘油为单独高压灭菌后产物;

[0015] 发酵培养基包括酵母粉10g、甘油30g,磷酸氢二钾3g/L,磷酸二氢钾1.5g/L,硫酸镁0.5g/L,硫酸铵0.35g/L,酵母浸粉0.2g/L,硫酸锰0.2g/L,硫酸亚铁0.1g/L,碳酸钙0.1g/

L;

[0016] S2.藻蓝素生物合成关键基因的合成及载体构建

[0017] 通过化学合成血红素加氧酶Ho1基因、铁氧还蛋白氧化还原酶基因PcyA的祖先序列以及自裂肽标签T2A,并将这些序列装入pMATE03载体,构建成功pMATE03-HO1-T2A-PcyA载体;

[0018] 所述血红素加氧酶Ho1基因(YP_214522.1),核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

[0019] 所述铁氧还蛋白氧化还原酶基因PcyA的祖先序列,核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0020] 所述自裂肽标签T2A,核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0021] S3.构建藻蓝素合成高效辅酶因子循环

[0022] 在血红素氧化酶和铁氧还蛋白氧化还原酶的诱导下,藻蓝素成功产生,然而,血红素转变为胆绿素这一步骤是限速步骤,需要辅酶因子NADPH的参与,通过敲除枯草芽孢杆菌外膜通道蛋白Tolc并导入nad基因,加速了辅酶因子循环,增加了藻蓝素的生成。

[0023] 优选的,所述构建成功的pMATE03-HO1-T2A-PcyA载体,通过电转方式转入表达菌株这种,获得含有HO1-T2A-PcyA基因的重组菌株。

[0024] 优选的,所述重组菌株的培养采用LB培养基或TB培养基。

[0025] 优选的,所述重组菌株使用发酵培养基进行发酵,使用麦芽糖进行诱导。

[0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0027] 本发明通过计算生物学,合成了一条铁氧还蛋白氧化还原酶基因PcyA的祖先序列,并采用枯草芽孢杆菌表达系统表达异源合成藻蓝素基因,且通过增加辅酶的合成,提高了藻蓝素的产量,摇瓶中达到了20.42mg/L的产量;提高了藻蓝素在芽孢杆菌表达系统中的产量,芽孢杆菌表达系统的使用为以后藻蓝素的纯化简便了内毒素去除步骤,藻蓝素提纯使用更加安全。

附图说明

[0028] 图1为本发明重组载体pMAT-HO1-T2A-pcyA质粒图谱。

具体实施方式

[0029] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0030] 一种改造枯草芽孢杆菌产藻蓝素的方法:

[0031] 其中培养基如下:

[0032] LB培养基:10g/L蛋白胨、10g/L氯化钠、5g/L酵母膏,121℃灭菌15min。

[0033] TB培养基:6g/L蛋白胨、5g/L甘油、12g/L酵母膏、17mM磷酸二氢钾、72mM磷酸氢二钾,115℃灭菌20min。

[0034] 实施例一:

[0035] 一种新兴的生成稳定酶的技术是祖先序列重建(ASR),这是一种基于同源序列集

合预测进化祖先的生物信息学方法。

[0036] ASR生成的酶通常具有改进的生物催化特性,例如增强的热稳定性、溶剂耐受性、和底物多样性。

[0037] 通过Mafft以来源于集胞藻属(Synechocystis sp.)PCC6803的pcyA为模板从NCBI比对到identify>60%的序列进行建库分析祖先序列,获得祖先序列后以枯草芽孢杆菌基因组为模型进行密码子优化。

[0038] 实施例二:

[0039] 委托擎科公司进行全基因化学合成来源于Prochlorococcus phage P-SSM2的血红素加氧酶HO-1基因(YP_214522.1),核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;合成铁氧还蛋白氧化还原酶基因PcyA的祖先序列,核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;合成SEQ ID NO.3所示的自裂肽标签T2A,将上述序列合成后通过桥式PCR装入pMATE03载体,构建成功pMATE03-HO1-T2A-PcyA载体。将上述载体通过电转的方法转入WB600表达菌株中,获得含有HO1-T2A-PcyA基因的重组菌株S1。重组菌株使用LB培养进行摇瓶发酵,当重组芽孢杆菌在37℃培养至OD 600值为0.6-0.8时,加入3%麦芽糖后在30℃继续培养24h。发酵蛋白表达检测结果如图所示,将上述重组菌株进行发酵,使用麦芽糖进行诱导,其藻蓝素含量达到14.52mg/L。

[0040] 实施例三:

[0041] 以B.subtilis 168的基因组为模板,用引物tolc-1-F/tolc-1-R和kan-F/kan-R分别扩增外膜通道蛋白的前500bp长度的基因片段tolc-1,以及扩增得到卡那霉素(Kanamycin)抗性基因片段kan;利用重叠PCR技术将两个片段连接,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测发现在2000bp左右出现特异性电泳条带,与理论值2002bp大小相符,即两个片段连接成tolc-1-kan片段。胶回收片段,BamHI限制酶酶切后,通过上述电转化方法将片段酶切后的amyE-1-kan转化到B.subtilis WB600中,涂板,挑取阳性克隆子,PCR验证kan基因片段,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测发现在1500bp左右出现特异性电泳条带,与理论值1502bp大小相符,说明单交叉互换方式成功将外膜通道蛋白tolc从B.subtilis WB600基因组中敲除,得到重组菌株S2。

[0042] 实施例四:

[0043] 以上述敲除外膜蛋白Tolc的枯草芽孢杆菌为底盘菌株,以电转方式导入pMATE03-HO1-T2A-PcyA载体,构建重组菌株S3,重组菌株使用TB培养基进行摇瓶发酵,当重组芽孢杆菌在37℃培养至OD 600值为1.2时,加入3%麦芽糖后在30℃继续培养24h。将上述重组菌株进行发酵,使用麦芽糖进行诱导,其藻蓝素含量达到20.42mg/L

[0044] 应理解的是,在任何实际实施方式的开发过程中,如在任何工程或设计项目中,可做出大量的具体实施方式决定。这样的开发努力可能是复杂的且耗时的,但对于那些得益于此公开内容的普通技术人员来说,不需要过多实验,所述开发努力将是一个设计、制造和生产的常规工作。

[0045] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

[0046] SEQ ID NO.1

[0047] HO-1基因：

[0048] ATGACCGTTGCTGATTTCTCCGTTCAGATCAAAGAAGGTACTAAGAAGAGCCACTCTGCTGCGGAGAA
CACCAGCTTCGTTGCGAGCTTCTTGCGTGGTGTGGTTTCTAAAGAATCTTACAAAGCGCTGGTTAAAGACCTGTAC
TACGTTTACCGTACTCTGGAAGAAGAGTTCGAGAAACACAAAGACCATCCGGTTGTAGGTAAACTGTACCTGCCGG
AACTGAACCGTGTTAACGCACTGGAACGTGATCTGCGTTTCTACTACGGTCCGATCTGGCGTTCTCTGATCATGCC
ATCCGAAGCGTGCGCGAACTACGTTTCTCGTATCAAATGCTGCTCTATCGAAGATCCAACTCTGCTGGTTGGTCAC
CACTACACTCGTTACCTGGGCGACCTGTCTGGTGGTCAGATCTTGAAAGGCATCGCGGAGAAAGCGATGGGTCTGA
AAGATGAAGGTCTGTACTTCTACGACTTCGACAAGATCGAGAACGCGAAGAAATACAAAGATGGTTACCGTGCGAT
TCTGAACGGTCTGGACGTTGACCAGCACCAGGTAGACGCTATCATCGTTGAAGCGAACTACGCGTTCCGTCTGAAC
ATGTATATGTTCGACACCTTGGAAGGTAACTGGTTCCAGTCCCTGATCCAGATGATCTTCGGTTTCATCAAATCTA
TCTTGAAGAAACGTAAATCCGAA。

[0049] SEQ ID NO.2：

[0050] Pcya祖先序列基因：

[0051] ATGAGAGGAAGAATATGCATTCTGTTAGCAGCTCCACCGGCAATGACGAGCAGCAAGAGCTCAAAAAC
AACGTTAGAACCGGTAAGAGCGCCTCAAGTTCCGGGAGTCGGCTCCATGATGCCGGTAAGAATGATTGTTGATCAG
AACAAAAAGACCTCTATGAACAGCGTGAAACTGGAAGATGCGGAGGGCTTATGCAGCGAACTGGCAAACGTGATAC
GAAATGCCATCGAGTCTCTGGATGATGTCAATGAACCTCTTGAATGCGATCCGGATTTAGAGGCGATTTATGAGGA
AATTGAGAAAGATGATCTTGTTATCAAGAACGAAATGTACAAATGCAAGGGCTTAAGAAAGATACACTTAGAAACG
GCTAAAACAGGCAAGAATCTCGATGTTCTCCACTGCGTATTTTTCCCAGATTTCGAGTATAACATTCCGATATTCG
GTTGCGATATTGTAGCTACACGCAACATCGTGACAGCAGCGATTGTGGACATTTCCCCAGTCCATGGATGTAGTCC
AGAAGAAATCTATTATGGTTACGATAAAATCGCTCCTATCTCCAACAGTTATCATTTCAAGGAAAAAAGACCACTT
CCACTGTGGGGTGATGAGATTTTTTCCCCGTATTGCAAATTCGTTCGTCTCCGGAACGAGGAAGAACAAGATGACT
TCGTCAGAATCGTTAAAGAATATTTGAACATCTTTTGCGATTGGGTTCGTAAAGCAGAAAAGGATTCCAATCATGG
TACATTAGATAACTGGGTAAATACTATGTTAAGACTTGACGATCAAATCTGGTACTGTAAGCAGCAGCGGAAAAAT
AAAAAGACGCTTGCCGTACTGTCTCAATGGTTCGACAAAGAATGGGCGGATAACTACATCAACAACATTCTTTTTG
ACAAACCTCCGAAGCTGAAGGAACAGCAGGATTATAACCCATTTGATTACGTGAACAGCATTAACCTTAAAACGGC
TGACTACACCTCTGACGAAGGATACATGTCCCAGTTACCGAGCTTTCAGCATCAGCGGGAAGCCCGGTATTTTATT
GACACCGAAACACATACGCACCAGATGAATCGCCTTGGAGCCAGTTTGGATAAGGACATGCAATATAACTTCTTGT
GGTTTATGTTAGGCAACCTTCGGGGCTTTTTGGTAGCGCAAAAATCACTGTTGACACTGATC。

[0052] SEQ ID NO.3

[0053] 自裂肽标签T2A

[0054] GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCA

[0055] 乙酰辅酶A合成酶基因：

[0056] ATGTCTCAGATCCACAAACACACCATCCCGGCTAACATCGCGGATCGTTGCCTGATCAATCCGCAGCA
GTACGAAGCGATGTACCAGCAGTCTATCAACGTTCCGGACACCTTCTGGGGTGAACAGGGTAAGATTCTGGACTGG
ATCAAACCGTACCAGAAAGTTAAGAACACCTCTTTCGCTCCAGGTAACGTTTCCATCAAATGGTACGAAGATGGTA
CTCTGAACCTGGCAGCAAACTGCCTGGACCGTCATCTGCAAGAGAACGGTGATCGTACCGCGATCATCTGGGAAGG
TGACGATGCGTCTCAGTCCAAACACATCTCTTACAAAGAACTGCACCGTGACGTTTGCCGTTTCGCTAACACCTTG
CTGGAACTGGGTATCAAGAAAGGTGACGTTGTTGCGATCTACATGCCAATGGTTCCGGAAGCGGCTGTTGCAATGC

TGGCGTGTGCTCGTATCGGTGCGGTTCACTCTGTTATCTTCGGTGGTTTCTCTCCAGAAGCTGTTGCTGGTCGTAT
CATCGACTCTAACAGCCGTCTGGTAATCACCTCTGATGAAGGTGTTCGTGCAGGTCGTTCTATTCCGCTGAAGAAG
AACGTGGATGACGCACTGAAGAATCCGAACGTGACCTCTGTTGAACACGTTGTTGTTCTGAAACGTACCGGTGGTA
AGATCGACTGGCAAGAAGGTCGTGACCTGTGGTGGCACGATCTGGTTGAACAGGCGTCTGATCAGCACCAGGCTGA
AGAAATGAACGCTGAGGACCCGCTGTTCATTCTGTACACTTCTGGTTCTACCGGTAAACCGAAAGGTGTTCTGCAC
ACTACCGGTGGTTACCTGGTTTACGCTGCGCTGACCTTCAAATACGTGTTCGACTACCATCCAGGTGACATCTACT
GGTGTACCGCGGACGTTGGTTGGGTTACCGGTCACTCTTACCTGCTGTACGGTCCGCTGGCGTGCGGTGCGACTAC
CTTGATGTTCGAAGGTGTTCCAAACTGGCCGACTCCGGCACGTATGGCACAGGTTGTTGACAAACACCAGGTTAAC
ATTCTGTATACCGCTCCAACCGCTATCCGTGCACTGATGGCAGAAGGTGACAAAGCGATCGAAGGTACTGACCGTT
CTTCTCTGCGTATCTTGGGTTCTGTTGGTGAACCAATCAATCCGGAAGCATGGGAATGGTACTGGAAGAAGATCGG
TAACGAGAAATGTCCGGTTGTTGATACCTGGTGGCAGACCGAAACTGGTGGTTTCATGATCACTCCGCTTCCAGGT
GCTACTGAACTGAAAGCGGGTTCTGCGACTCGTCCGTTCTTCGGTGTTCAGCCGGCTCTGGTTGACAACGAAGGTA
ACCCGCTGGAAGGTGCTACCGAAGGTTCTCTGGTTATCACCGACAGCTGGCCAGGTCAGGCGCGTACCTTGTTCGG
TGACCACGAACGTTTCGAACAGACCTACTTCTCTACCTTCAAGAACATGTACTTCTCTGGTGACGGTGCACGTCGT
GACGAAGATGGTTACTACTGGATCACCGGTCGTGTTGACGACGTTCTGAACGTTTCTGGTCATCGTCTGGGTACTG
CGGAAATCGAATCTGCGCTGGTTGCACATCCGAAGATCGCGGAAGCTGCTGTTGTTGGTATCCCACACAACATCAA
AGGTCAGGCAATCTACGCGTACGTTACGCTGAACCACGGTGAGAAACCGTCTCCGGAACTGTACGCAGAAGTTCGT
AACTGGGTTCGTAAAGAAATCGGTCCGTTGGCTACTCCGGACGTTCTGCACTGGACCGACTCTCTGCCAAAGACTC
GTTCCGGTAAGATCATGCGTCGTATCTTGCGTAAGATCGCTGCTGGTGACACCTCTAACCTGGGTGACACTTCTAC
TCTGGCTGATCCGGGTGTTGTTGAGAAACTGCTGGAAGAGAAACAGGCGATCGCTATGCCGAGCTAA。

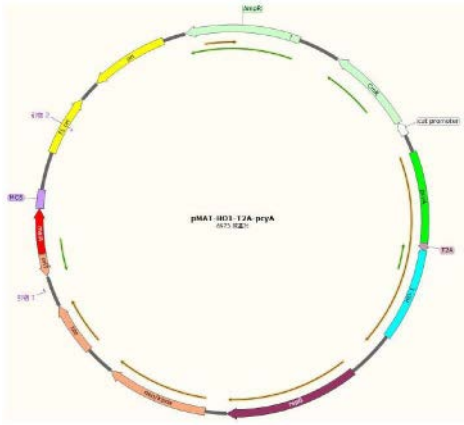


图1