



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106916775 B

(45)授权公告日 2020.03.17

(21)申请号 201710099443.4

(22)申请日 2017.02.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106916775 A

(43)申请公布日 2017.07.04

(73)专利权人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛市崂山区松岭路
238号

(72)发明人 曾名湧 高风正 吴浩浩 黄敏
冯广鑫

(74)专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有
限公司 37201

代理人 孙洪叶

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

C12N 15/74(2006.01)

C12P 3/00(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(56)对比文件

管莉菠等.Pseudomonas putida GM6多聚磷

酸盐激酶(ppk)基因的克隆及表达.《土壤学报》
.2007,第44卷(第4期),

张广宇.大肠杆菌胸苷激酶和聚磷酸激酶的
重组表达与应用研究.《中国优秀硕士学位论文
全文数据库 基础科学辑》.2014,(第6期),

杜宏伟等.聚磷酸激酶基因在假单胞菌中的整
合和表达.《环境科学》.2009,第30卷(第10期),

Fengzheng Gao等.Overproduction,
purification,and characterization of
nanosized polyphosphate bodies from
Synechococcus sp.PCC 7002.《Gao et al.
Microb Cell Fact》.2018,第17卷(第27期),

Junichi Kato等.Cloning, sequence and
characterization of the polyphosphate
kinase encoding gene (ppk) of Klebsiella
aerogenes.《GENE》.1993,第137卷

Seung-Jin Lee等.Molecular
characterization of polyphosphate kinase
(ppk) gene from Serratia marcescens.
《Biotechnology Letters》.2003,第25卷

审查员 马晓霞

权利要求书1页 说明书5页

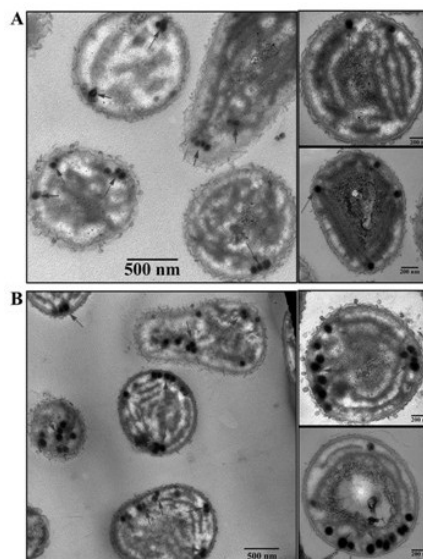
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株及其制
备方法

(57)摘要

本发明提供了高产纳米多聚磷酸体的转基
因藻株及其制备方法,该转基因藻株是在聚球藻
7002的基础上通过导入含有同源ppk基因的重组
pSyn_1质粒并经过筛选鉴定得到的转基因微藻。
所述转基因藻株产多聚磷酸体的能力较野生株
提高90-150%,其诱导积累多聚磷酸体的方法为
利用0.5-5 μM的镍离子进行诱导。该藻株可操作
性强,遗传稳定性好,外源基因持续表达超过1
年。利用该藻株生产的多聚磷酸体为纳米级别,
尺度在100 nm范围内,提取过程中可以维持良好
的纳米形态。



1. 一种高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株,其特征在於,该藻株是在聚球藻7002藻株的基础上,导入含有ppk基因的重组pSyn_1质粒而得到的转基因聚球藻7002藻株;所述ppk基因的前引物:CCCAAGCTTGAAGGAGATAAAAAGTATATGTCCTCTGCG;ppk后引物:CGGGGTACCCTAATCCAAGCTGTCCTGGAG。

2. 权利要求1所述的高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株的制备方法,其特征在於,包括如下步骤:

1) 目的基因的提取、克隆和修饰:提取聚球藻7002的基因组,根据聚球藻7002ppk基因的序列设计特异引物,引物两端添加相应的酶切位点和核糖体结合位点,通过PCR得到目的基因,纯化备用;

2) 目的基因重组到克隆质粒,利用大肠杆菌对克隆质粒和表达质粒进行繁殖,分别对两种质粒进行抽提纯化;

3) 对抽提得到的上述两种质粒分别用两种相同的限制酶进行酶切,酶切后的产物进行切胶回收纯化,纯化后的表达质粒和ppk基因按照摩尔浓度1:5-1:10的比例,利用DNA连接酶连接,得到重组表达质粒,通过大肠杆菌进行克隆繁殖,提取纯化备用;

4) 将步骤3) 提纯后的重组表达质粒加入到聚球藻7002中进行自然转化,再利用含盐酸壮观霉素的固体平板对转化株进行筛选;

5) 对筛选得到的藻株进行质粒提取,利用ppk基因特异性引物扩增,对得到的扩增产物进行序列鉴定,得到重组ppk基因的聚球藻7002藻株。

3. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在於,上述步骤2) 中的表达质粒为pSyn_1表达质粒。

4. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在於,上述步骤3) 中利用DNA连接酶于16℃连接1-3h。

5. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在於,上述步骤4) 具体为,将步骤3) 重组后的质粒加入到浓缩10-15倍的新鲜培养液洗涤过的生产状态良好的、OD₇₅₀=1-2的聚球藻7002,进行自然转化,转化24h即可,再利用含盐酸壮观霉素的固体平板对转化株进行筛选。

6. 权利要求1所述的高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株在高产纳米多聚磷酸体上的应用。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在於,该转基因藻株在高产纳米多聚磷酸体过程中,在其培养基中添加0.5-5μM的镍离子进行诱导表达;且在培养基中添加有10μg/L的盐酸壮观霉素。

高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属基因工程技术领域,具体涉及一种高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株。

背景技术

[0002] 矿物质营养缺乏,尤其是钙、铁、锌缺乏,是当今世界最严重的公共卫生问题之一,是一种典型的隐性饥饿,易发于孕妇和儿童人群中,在全球的流行率远高于维生素营养缺乏。矿物质营养不良对人体健康的负面影响从生命的早期便开始建立,会导致人体生长发育迟缓、认知能力差、嗜睡、注意力难集中和更易发生重大感染性疾病,从而降低个体接受教育的能力、体力劳动能力和寿命预期。矿物营养干预对于人们摆脱矿物质营养缺乏的“贫穷陷阱”,提高人们的健康水平具有特别重要的意义。

[0003] 生物矿化纳米结构在矿物质营养干预实践中具有独特的应用优势,多聚磷酸体是存在于许多生物细胞中的一种主要由长链多聚磷酸盐构成的生物矿化结构。许多生物细胞(如原核和真核微生物、原生动物、哺乳动物的血小板细胞和成骨细胞等)中会合成长链(几十到几百个残基不等)多聚磷酸盐(PolyP),并以此为主要成分,构成一种纳米或亚微米尺度的包涵体——多聚磷酸体(Polyphosphate bodies, PPB),亦称异染粒(Volutin granules)或钙酸体(Acidocalcisomes)。近年来,许多研究证明多聚磷酸体与多种生物功能有关。不同于食品工业中常用的短链PolyP,生物来源的长链PolyP很难被哺乳动物肠道中的碱性磷酸酶水解,故能够经口到达肠道,以小窝蛋白介导的内吞作用方式被肠道上皮细胞吸收,并起到保护肠道组织免受氧化损伤、炎症、纤维化和癌变等病变的益生作用。多聚磷酸体可以为细胞提供合成DNA的原料以及储存或提供细胞所需的矿物元素,具有开发成为一种天然纳米矿物质营养补充剂或强化剂的潜力。尽管多聚磷酸体的功能特性被逐渐认可,但是目前还没有利用微生物进行大规模发酵生产的案例,选择一种合适的生产多聚磷酸体的“细胞工厂”对于其开发应用意义重大。

[0004] 聚球藻7002是近海的一种模式微藻,也是目前发现的分裂速度最快的蓝细菌,具有天然的外源DNA转化系统,其全基因组也已被破译,是目前公认的一种理想的“工程微藻”构建平台。多株转基因聚球藻7002藻株被先后构建,具有大规模发酵生产多种活性物质的潜力。

[0005] 尽管微藻进行转基因的方法较为成熟,但是仍然面临成功率低,诱导表达困难,表达效率不高,表达产物品质不高等诸多问题和挑战,同时,一些外源基因的表达会对微藻的生长动力学带来一些不利影响。因此在微藻转基因的过程中,选择合适的藻株、质粒和目的基因至关重要。一株遗传稳定性好、表达效率高的藻株对于提高微藻的综合利用价值具有非常重要的意义。

[0006] 纳米尺度的活性物质在功能上具有非常明显的优势。聚球藻可以积累多聚磷酸体,且粒径为纳米尺度,更容易被细胞吸收利用。多聚磷酸体的积累受 ppk 基因的调控,可以通过导入重组 ppk 基因外源质粒的方法,诱导聚球藻过表达 ppk 基因以达到纳米多聚磷酸体过度积累的目的。在转基因过程中选择合适的同源基因以及含有相应藻株容易启动的启动

子的质粒会大幅提高外源基因表达的成功率。相比较于其他微生物,利用聚球藻进行相关外源基因的表达具有许多难以比拟的优势:(1)聚球藻7002为天然感受态细胞,自然状态下可以吸收外源质粒,方便进行外源基因导入;(2)微藻作为光自养生物,分裂速度快,生产效率高,可以利用海水在光照下进行大规模生产,不会带来侵占耕地、能源浪费等问题,且海水中丰富的矿物元素可以丰富多聚磷酸体的元素组成,提高其功能特性;(3)微藻本身的营养价值非常高,在转基因微藻生产相关活性物质的同时,所获得的藻体及发酵过程中产生的次级代谢产物等都可以用于功能保健食品和药物开发等进行高值化利用;(4)外源基因表达稳定,遗传稳定性好。

[0007] 通过转基因方法获得高产纳米多聚磷酸体藻株对于提高微藻的研究利用价值以及纳米多聚磷酸体的广泛应用具有非常重要的意义。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株及制备方法。本发明在聚球藻7002藻株的基础上,导入含有 ppk 同源基因的重组pSyn_1质粒,通过诱导目的基因的表达以达到积累纳米多聚磷酸体的目的。该藻株能够快速积累大量的纳米多聚磷酸体,遗传稳定性好,可操作性强。

[0009] 本发明另一方面涉及上述转基因藻株的应用,用于发酵生产纳米多聚磷酸体;纳米多聚磷酸体可以应用于提高肠道免疫功能性产品的开发。

[0010] 为了实现本发明目的,本发明采取的具体技术方案为:

[0011] 一种高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株,该藻株是在聚球藻7002藻株的基础上,导入含有 ppk 同源基因的重组pSyn_1质粒而得到的转基因聚球藻7002藻株。

[0012] 上述高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株的制备方法,包括如下步骤:

[0013] 1) 目的基因的提取、克隆和修饰:提取聚球藻7002的基因组,根据聚球藻7002 ppk 基因的序列设计特异引物,引物两端添加相应的酶切位点和核糖体结合位点,通过PCR得到目的基因,纯化备用;

[0014] 2) 目的基因重组到克隆质粒,利用大肠杆菌对克隆质粒和表达质粒进行繁殖,分别对两种质粒进行抽提纯化;

[0015] 3) 对抽提得到的上述两种质粒分别用两种相同的限制酶进行酶切,酶切后的产物进行切胶回收纯化,纯化后的表达质粒和 ppk 基因按照摩尔浓度1:5-1:10的比例,利用DNA连接酶连接,得到重组表达质粒,通过大肠杆菌进行克隆繁殖,提取纯化备用;

[0016] 4) 将步骤3)提纯后的重组表达质粒加入到聚球藻7002中进行自然转化,再利用含盐酸壮观霉素的固体平板对转化株进行筛选;

[0017] 5) 对筛选得到的藻株进行质粒提取,利用 ppk 基因特异性引物扩增,对得到的扩增产物进行序列鉴定,得到重组 ppk 基因的聚球藻7002藻株。

[0018] 上述步骤2)中的表达质粒优选为pSyn_1表达质粒。

[0019] 上述步骤3)中利用DNA连接酶于16℃连接1-3 h。

[0020] 上述步骤4)具体为,将步骤3)重组后的质粒加入到浓缩10-15倍的新鲜培养液洗涤过的生产状态良好的、 $OD_{750}=1-2$ 的聚球藻7002,进行自然转化,转化24 h即可,再利用含抗生素的固体平板对转化株进行筛选。

[0021] 上述高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株在高产纳米多聚磷酸体上的应用;其中,在该转基因藻株的培养基中添加0.5-5 μM 的镍离子进行诱导表达;且对聚球藻7002转基因藻株进行培养时,在培养基中添加有10 $\mu\text{g/L}$ 的盐酸壮观霉素。

[0022] 本发明的优点是:

[0023] 1、本发明巧妙地利用微藻进行纳米多聚磷酸体的生产,生产方式绿色环保,副产物(藻渣、次级代谢产物等)研究利用价值高。2、利用模式微藻聚球藻7002进行转基因操作,操作简单,成功率高,遗传稳定性好。3、导入的基因为聚球藻7002同源*ppk*基因,外源质粒pSyn_1含有蓝藻来源的启动子,更容易进行翻译和表达,同源基因表达刺激积累的多聚磷酸体不存在品质问题。4、采用镍离子诱导外源质粒启动子启动,促进转基因微藻过量积累多聚磷酸体,方法简单便捷;5、转基因藻株具有高产多聚磷酸体的能力,且积累的多聚磷酸体为纳米尺度,稳定性良好,具有更小的粒径,更容易被吸收利用。

[0024] 同时,多聚磷酸体可以富集海水中丰富的矿物元素,可能具有更好的功能特性。显然,本发明得到了研究利用价值很高的高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株,并得到了藻株制备及外源基因诱导表达的方法,具有非常广阔的市场前景。

附图说明

[0025] 图1为重组质粒构建电泳图;其中,A: 泳道a: *ppk* 与pEASY-Blunt zero重组克隆质粒;泳道b: 克隆质粒双酶切;泳道c: pSyn_1 表达质粒;d: pSyn_1 质粒双酶切;泳道M: 1 Kb DNA Ladder;B: 泳道 a: *ppk*与pSyn_1重组质粒;泳道b: 质粒单酶切;泳道c: 质粒双酶切;泳道 M: 1 Kb DNA Ladder。

[0026] 图2为聚球藻7002细胞电镜图片;其中A: 野生型;B: 转基因型。

[0027] 图3为纳米多聚磷酸体粒径和电镜分析图。

[0028] 图4为镍离子浓度对纳米多聚磷酸体产量的影响。

具体实施方式

[0029] 下面结合实例对本发明的方法做进一步说明,实施例1中未注明具体条件的实验方法,通常可按常规条件进行。

[0030] 实施例1:

[0031] 1) 目的基因的获取

[0032] 特异性引物设计:

[0033] *ppk* 前引物:CCCAAGCTTGAAGGAGATAAAAAGTATATGTCCTCTGCG

[0034] *ppk* 后引物:CGGGGTACCCTAATCCAAGCTGTCCTGGAG

[0035] 前后引物分别添加Hind III 和Kpn I酶切位点,前引物添加GAAGGAG序列的RBS序列。

[0036] PCR条件:50 μL 反应体系,94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 1 min 72 $^{\circ}\text{C}$) 循环30次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应10 min。

[0037] 目的基因经过常规方法纯化、克隆后备用。

[0038] 2) 重组pSyn_1质粒的构建:pSyn_1质粒和目的基因经Hind III 和Kpn I双酶切,酶切产物经纯化后进行连接,pSyn_1质粒100 ng和*ppk*基因500 ng,T4 DNA连接酶16 $^{\circ}\text{C}$ 连

接3 h,连接后的质粒经常规方法克隆,酶切鉴定质粒的正确性,提纯后备用。

[0039] 3) 重组转基因藻株的构建及筛选:100 ng纯化后的重组质粒加入到浓缩15倍的新鲜培养基洗涤过的100 μ L聚球藻7002藻液($OD_{750}=1$)中,自然状态下静置培养24 h,取5 μ L涂布到含10 μ g/L盐酸壮观霉素的固体平板上进行筛选,对筛选得到的单克隆藻株进行鉴定,得到重组 ppk 基因的转基因藻株。

[0040] 4) 转基因藻株培养于含10 μ g/L的盐酸壮观霉素的液体培养基中,加入2 μ M的硝酸镍对转基因藻株进行诱导,培养1周后检测纳米多聚磷酸体的含量。经诱导的藻株的纳米多聚磷酸体的含量相较野生株提高90%。

[0041] 实施例2:

[0042] 1) 目的基因的获取

[0043] 特异性引物设计:

[0044] ppk 前引物: CCCAAGCTTGAAGGAGATAAAAAGTATATGTCCTCTGCG

[0045] ppk 后引物: CGGGGTACCCTAATCCAAGCTGTCCTGGAG

[0046] 前后引物分别添加Hind III 和Kpn I酶切位点,前引物添加GAAGGAG序列的RBS序列。

[0047] PCR条件:50 μ L 反应体系,94 $^{\circ}$ C 5 min,(94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 1 min 72 $^{\circ}$ C)循环30次; 72 $^{\circ}$ C反应10 min。

[0048] 目的基因经过常规方法纯化、克隆后备用。

[0049] 2) 重组pSyn_1质粒的构建:pSyn_1质粒和目的基因经Hind III 和Kpn I双酶切,酶切产物经纯化后进行连接,pSyn_1质粒100 ng和 ppk 基因1 μ g,T4 DNA连接酶16 $^{\circ}$ C连接1 h,连接后的质粒经常规方法克隆,酶切鉴定质粒的正确性,提纯后备用。

[0050] 3) 重组转基因藻株的构建及筛选:100 ng纯化后的重组质粒加入到浓缩10倍的新鲜培养基洗涤过的100 μ L聚球藻7002藻液($OD_{750}=2$)中,自然状态下静置培养24 h,取5 μ L涂布到含10 μ g/L盐酸壮观霉素的固体平板上进行筛选,对筛选得到的单克隆藻株进行鉴定,得到重组 ppk 基因的转基因藻株。

[0051] 4) 转基因藻株培养于含10 μ g/L盐酸壮观霉素的液体培养基中,加入1 μ M的硝酸镍对转基因藻株进行诱导,培养1周后检测纳米多聚磷酸体的含量。经诱导的藻株的纳米多聚磷酸体的含量相较野生株提高150%。

[0052] 如图1所示,A图中两种质粒被双酶切以后,被切割成含相应酶切位点的两段。泳道b中约2000 bp的片段为目的基因 ppk 片段,泳道d约4000 bp片段为切割后的质粒,泳道d只有一条条带是因为另一段被切割的部分非常短,电泳结果观察不到。如图1.B所示,含 ppk 基因的重组pSyn_1质粒单酶切后得到了6000 bp左右的片段,为目的基因约2000 bp和pSyn_1质粒约4000 bp,双酶切后又分别得到了预期分子量大小的质粒和目的基因,酶切鉴定结果证明质粒构建成功。结合基因测序结果,表明重组质粒构建成功。

[0053] 如图2所示,图中黑色斑点为多聚磷酸体,可以看到转基因型的多聚磷酸体数量(8-11个)显著多于野生型细胞中的数量(2-5个),且多聚磷酸体的粒径大多低于100 nm。

[0054] 如图3所示,图3.A为通过水煮、纯化等方法得到的纳米多聚磷酸体的粒径分析结果,粒径结果显示大多数粒径在100 nm以下,14 nm和40 nm两种粒径的较多。对提取得到纳米多聚磷酸体进行电镜观察,图3.B,可以看到提取后纳米多聚磷酸体维持了很好的纳米形

态。

[0055] 如图4所示,镍离子可以诱导pSyn_1质粒进行表达,不同浓度镍离子的诱导效果不同,wild组为野生型对照组,其他组添加了不同浓度的镍离子,纵坐标荧光值可以反映多聚磷酸体的含量,但是DAPI荧光法反映的是多聚磷酸体表面的PolyP含量,所以实际产量大于荧光值反应的数值。

[0056] 通过本发明得到的转基因藻株而制备的纳米多聚磷酸体的产量较原生藻株提高90-150%,且转基因微藻具有更好的环境适应性,包括温度耐受性和重金属离子耐受能力。本发明中的藻株积累的PPB为纳米尺度,粒径范围为十几纳米到一百纳米不等,相比较其他生物来源的多聚磷酸体具有更小的粒径,且分离得到的纳米多聚磷酸体的稳定性良好。本发明中的藻株遗传稳定性好,目前已稳定表达超过1年。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国海洋大学
- [0003] <120> 高产纳米多聚磷酸体的转基因藻株及其制备方法
- [0004] <130> 2017
- [0005] <160> 2
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 39
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] cccaagcttg aaggagataa aaagtatatg tcctctgcg 39
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 30
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] cggggtaccc taatccaagc tgcctggag 30

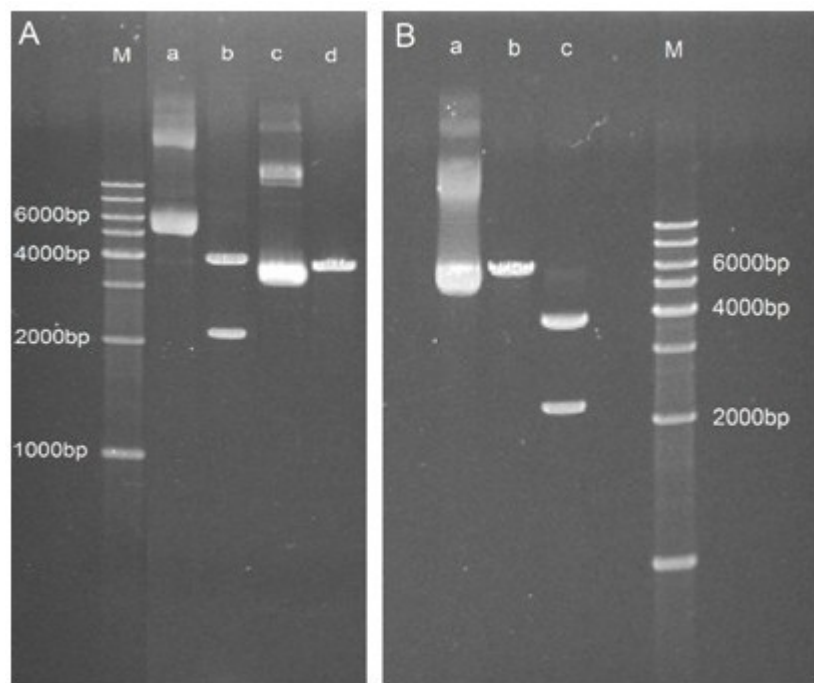


图1

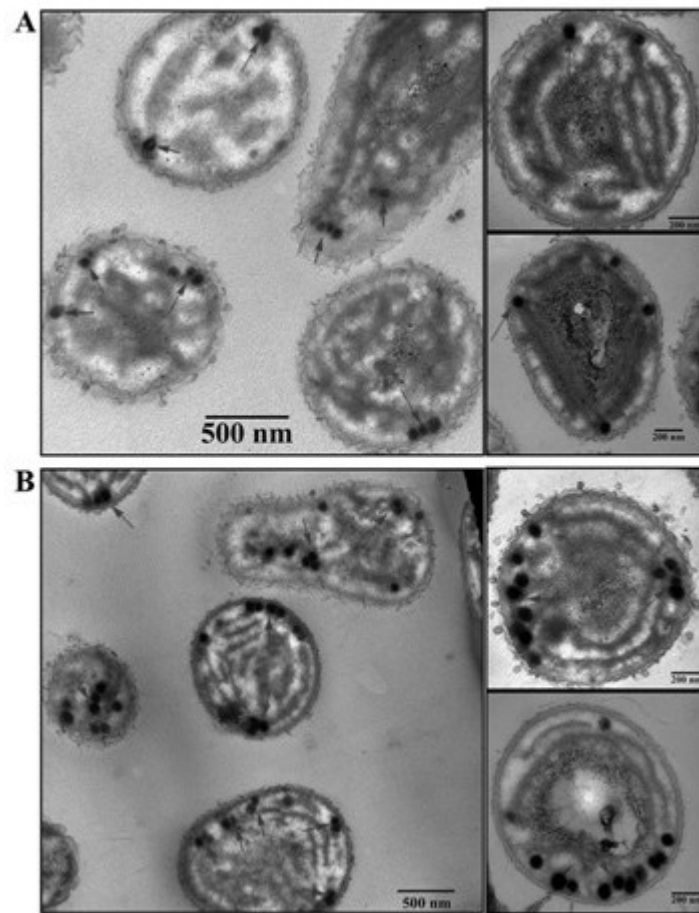


图2

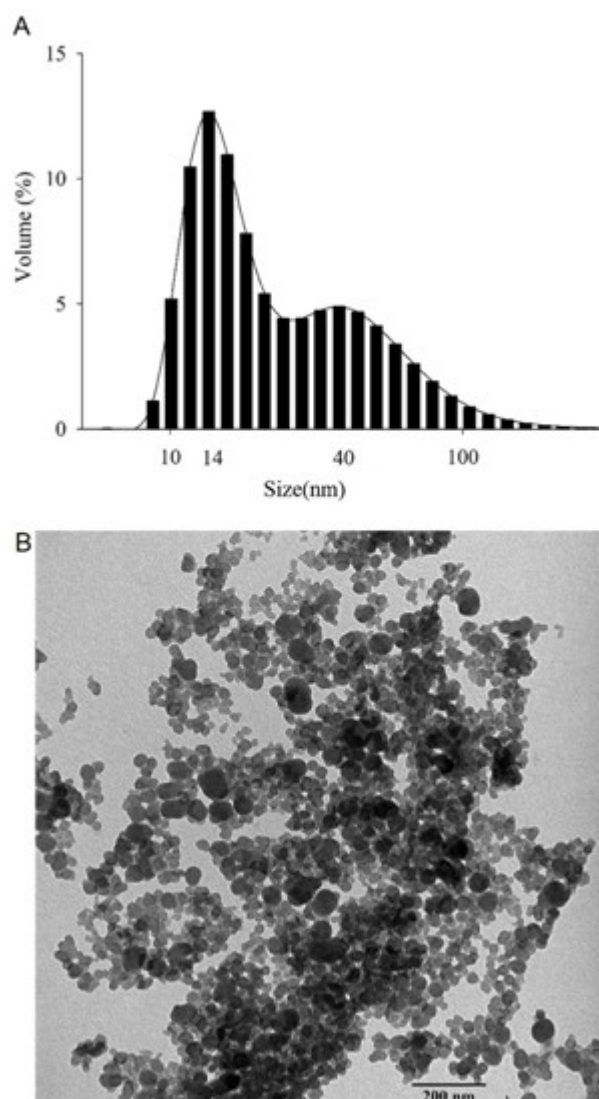


图3

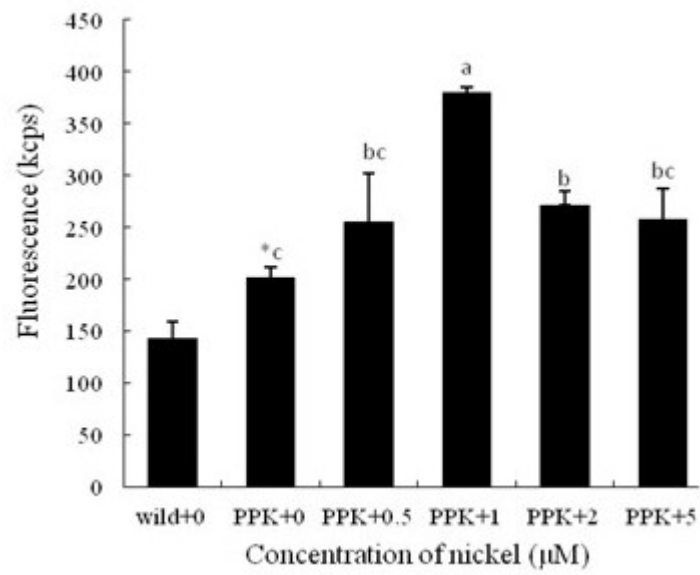


图4