(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112646830 A
(43)申请公布日 2021.04.13

(21)申请号 201910960727.7

(22)申请日 2019.10.10

(71)申请人 天津科技大学
地址 300457 天津市经济开发区第十三大街29号

(72)发明人 戴玉杰 宁玉林 吕和鑫 张黎明 满淑丽 贾士儒

(51)Int.Cl.
C12N 15/74(2006.01)
C12N 15/66(2006.01)
C12N 15/65(2006.01)
C12N 15/56(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12R 1/01(2006.01)

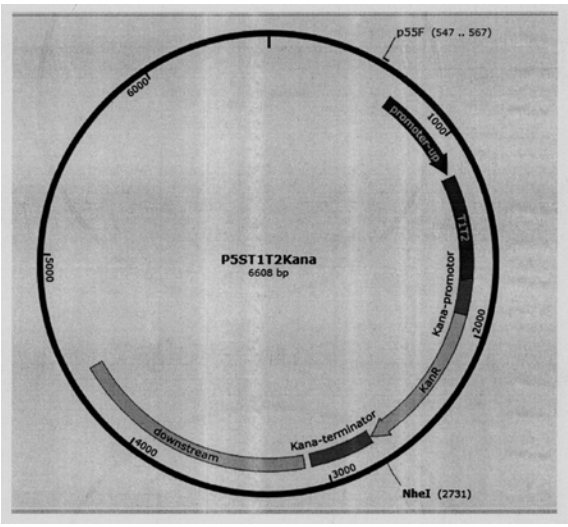
权利要求书2页 说明书6页
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

一种通用质粒及其构建方法和集胞藻表达外源基因的新方法

(57)摘要

本发明通过基因工程法构建了一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中表达的通用质粒，该质粒利用集胞藻PCC 6803的psbA2基因起始密码子ATG前510bp片段作为同源重组上游臂，以psbA2基因ORF片段为下游臂基础上，在Kana抗性基因与终止子之间插入目的基因获得通用质粒P5ST1T2Kana，利用Kana抗性基因启动子启动kana抗性和目的基因在集胞藻内的串联表达。同时，本发明以上述通用质粒为载体，构建了可以Kana基因启动子启动Kana抗性基因与纤维素酶CBHII基因串联表达的集胞藻PCC 6803工程藻株PSKC II，实现纤维素酶在集胞藻中的异源表达的新手段。



CN 112646830 A

1.一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中串联表达的通用质粒,以及利用此质粒构建的表达纤维素外切酶的基因工程藻。

2.如权利要求1所述的通用质粒,其特征在于,可在大肠杆菌与集胞藻PCC 6803中穿梭表达。利用集胞藻PCC6803的psbA2基因起始密码子ATG前510bp片段作为同源重组载体启动子兼做上游臂,以psbA2基因ORF片段为下游臂,可将目的基因与Kana抗性基因导入到集胞藻PCC 6803并整合到基因组中,在Kana抗性基因与终止子之间插入目的基因,利用Kana抗性基因启动子启动Kana抗性和目的基因在集胞藻内的串联表达,得到可在大肠杆菌与集胞藻PCC6803中穿梭表达,利用Kana抗性基因启动子启动目的基因表达的通用质粒载体P5ST1T2Kana,实现外源基因在集胞藻中的表达。

3.如权利要求1所述的通用质粒,其构建步骤如下:

(1)质粒构建以质粒P5ST1T2-downstream为基础,用限制性内切酶BamHI处理puc4K质粒回收获得Kana抗性序列,序列如序列表中SEQ ID NO:14所示;

(2)以序列表中SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8为上下游引物,以步骤(1)回收所得的序列为模板,通过PCR扩增技术获得Kana启动子与Kana抗性基因序列:Promote-Kana,通过引物在Promote-Kana上下游两端分别添加酶切位点BamHI与NheI,获得序列如序列表中SEQ ID NO:15所示;

(3)以序列表中SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10为上下游引物,以步骤2回收所得的序列为模板,通过PCR扩增技术获得Kana终止子基因序列:terminator,通过引物在terminator上下游两端分别添加酶切位点NheI与BamHI,获得序列如序列表中SEQ ID NO:16所示;

(4)用限制性内切酶BamHI处理质粒载体PUC18,将步骤(2)与步骤(3)所获得的序列在重组酶的作用下连接至酶切纯化回收所得的PUC18质粒中,得到T载质粒puc18-Kana;

(5),用限制性内切酶BamHI处理质粒载体P5ST1T2-downstream与T载质粒puc18-Kana,将酶切T载质粒puc18-Kana所获得的Pro-Kana-NheI-terminator片段在连接酶的作用下连接至回收所得的P5ST1T2-downstream载体上,制得可穿梭表达的通用质粒载体命名为P5ST1T2Kana。

4.如权利要求1所述的通用质粒,其特征在于,所述步骤(2)中,扩增引物核苷酸序列如下:

Pro-Kana-F:5'-CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG-3';

Pro-Kana-R:5'-CCAATTCTGAGGCTAGCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTG-3';

如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述步骤(3)中,扩增引物核苷酸序列如下:

Terminator-F:5'-GAGTTTTTCTAAGCTAGC TCAGAATTGGTTAATTGGT-3'

Terminator-R:5'-GAGCTCGGTACCCGGGGATCCAAAACGACGGCCAGTGAATT-3'

扩增体系如下:

正反向引物各1μL,模板1μL,重组酶12.5μL,ddH20 9.5μL,总体系共25μL;

扩增反应条件如下:

94℃预变性3min;98℃变性10s,55℃复性15s,72℃延伸1.5min,30个循环后;72℃10min,4℃保;

酶切反应体系如下:

DNA 3μL,内切酶1μL,10×Buffer1μL,ddH20 5μL,总体系共10μL。

5.本发明还涉及如权利要求1-4所述通用质粒在集胞藻中表达外源基因中的应用。

6.如权利要求1所述的集胞藻工程藻株,其特征在于利用此串联表达质粒在集胞藻PCC6803中表达纤维素酶,实现纤维素酶CBH II的光合生物生产新方法。

7.如权利要求1所述的表达纤维素外切酶的基因工程藻,其构建步骤如下:

(1)以序列表中SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18为上下游引物,以GenBank数据库中里氏木霉(Trichoderma reesei QM9414)的相应基因序列为模板,通过PCR技术获得纤维素外切酶CBH II基因片段,并且通过引物在目的基因两端添加同源臂序列,序列如序列表中SEQ ID NO:19所示;

(2)用限制性内切酶Nhe I处理权利要求1-4所述的通用质粒P5ST1T2Kana,将(1)所获得的纤维素外切酶CBH II基因片段在重组酶的作用下进行同源重组,制得重组表达载体质粒PSKC II,通过自然转化法将重组表达载体质粒PSNC II转化至集胞藻PCC6803中,得到工程藻株集胞藻PSKC II。

8.如权利要求1所述的集胞藻工程藻株,其特征在于,所述权利要求7,步骤(1)中,扩增引物核苷酸序列如下:

SEQ ID NO:17:Kana-CBH II-F:5'-GATGAGTTTTTCTAAGCTAGCATGCAAGCTTGCTCAAGCGT-3'

SEQ ID NO:18:Kana-CBH II-R:5'-ATTAACCAATTCTGAGCTAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTG-3'

扩增体系如下:

正反向引物各1μL,模板1μL,重组酶12.5μL,ddH2O 9.5μL,总体系共25μL。

扩增反应条件如下:

94℃预变性3min;98℃变性10s,55℃复性15s,72℃延伸1.5min,30个循环后;72℃10min,4℃保。

一种通用质粒及其构建方法和集胞藻表达外源基因的新方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中表达的通用质粒及其构建方法,并且公开了一种利用此质粒在集胞藻中表达外源基因的新方法,属于基因工程领域。

背景技术

[0002] 质粒是是闭合环状的双链DNA分子,具有自主复制能力,使其在子代细胞中也能保持恒定的拷贝数,并表达所携带的遗传信息。质粒在所有的细菌类群中都可发现,它们是独立于细菌染色体外自我复制的DNA分子。细菌质粒是DNA重组技术中常用的载体。载体是指把一个有用的外源基因通过基因工程手段,送进受体细胞中去进行增殖和表达的工具。将某种目标基因片段重组到质粒中,构成重组基因或重组体。然后将这种重组体经微生物学的转化技术,转入受体细胞中,使重组体中的目标基因在受体菌中得以繁殖或表达,从而改变寄主细胞原有的性状或产生新的物质。质粒构建技术是基因工程常用的技术之一。质粒在有些菌株细胞内可以随宿主基因组一起复制,但在有些菌中如蓝细菌,质粒只是一种载体将目的基因导入藻细胞,随后需要通过基因同源重组将目的基因整合到宿主的基因组中,实现目的基因在宿主细胞内的表达。

[0003] 蓝藻是一类能进行植物型产氧光合作用的原核生物,集胞藻(Synechocystis sp.PCC6803)是一种具有自然转化系统的单细胞蓝藻,具有生长速度快、培养条件简单、不生产毒素、细胞结构简单、遗传背景清楚、方便分子操作等特点,它能利用光能进行自养生长,是光合作用分子生物学研究的重要模式生物之一。鉴于蓝藻进行外源基因易操作,以及产物分析方便,以及表达过程可以不消耗有机碳源等特点,使得蓝藻的分子生物学改造受到广泛关注。

[0004] 对蓝藻进行分子生物学改造,常用的质粒是pBluescript SK及其改造质粒,如pBluescript SK T1T2质粒,它是以集胞藻PCC6803的psbA2基因起始密码子ATG前510bp片段作为同源重组载体启动子兼做上游臂,以psbA2基因ORF片段为下游臂,可将目的基因和Kana抗性基因导入到集胞藻PCC 6803并整合到基因组中。目的基因是导入到质粒的psbA2基因起始密码子ATG前510bp片段(光感启动子)的后面,通过psbA2基因ATG前510bp片段作为目的基因的启动子启动目的基因的表达。但是该启动子有赖于光照,在无光条件下启动能力减弱。

[0005] 为了克服光感启动子缺陷,实现外源目的基因在集胞藻内表达不依赖于光,同时尽量较小质粒长度,本发明考虑采用Kana抗性基因启动子作为Kana抗性蛋白和目的基因表达的共同启动子,在Kana抗性基因与终止子之间插入目的基因,利用Kana抗性基因启动子启动Kana抗性和目的基因在集胞藻内的串联表达,得到可在大肠杆菌与集胞藻PCC6803中穿梭表达的通用质粒载体P5ST1T2Kana。

[0006] 利用纤维素酶可以将不溶于水的固态纤维素水解为可溶的寡糖或单糖,是生物质利用的重要步骤。相对于化学法处理纤维素,利用纤维素酶水解纤维素具有条件温和,有毒

产物少和环境影响小等特点。随着造纸、环境和生物能源产业的发展，纤维素酶的应用越来越广泛。纤维素酶为一大类酶的总称，分为内切酶和外切酶等多种。这些酶目前多是通过霉菌或细菌利用有机碳源发酵获得，生产过程中消耗大量有机碳源，比产生大量温室气体，如能够利用光合生物来生产纤维素酶，就可以不消耗有机碳源，利用无机盐、水与二氧化碳等，在阳光作用下产纤维素酶，不仅降低了有机碳源消耗，还会有效利用温室气体。

[0007] 本发明通过基因工程法构建了一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中表达的通用质粒，该质粒利用集胞藻PCC 6803的psbA2基因起始密码子ATG前510bp片段作为同源重组上游臂，以psbA2基因ORF片段为下游臂基础上，在Kana抗性基因与终止子之间插入目的基因，利用Kana抗性基因启动子启动Kana抗性和目的基因在集胞藻内的串联表达。

[0008] 同时，本发明以上述通用质粒为载体，构建了可以Kana基因启动子启动Kana抗性基因与纤维素酶CBH II基因串联表达的集胞藻PCC 6803工程藻株，实现外源基因在集胞藻中的异源表达的新手段。

发明内容

[0009] 为了克服现有技术的缺点与不足，本发明目的在于提供一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中串联表达的通用质粒及其构建方法。

[0010] 本发明另一个目的是提供一种利用Kana抗性基因启动子启动纤维素酶CBH II在集胞藻PCC6803表达的基因工程藻，实现纤维素酶CBH II的光合生物生产新方法。

[0011] 本发明的目的通过下述方案实现：

[0012] 一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中串联表达的通用质粒构建方法包括如下步骤：

[0013] (1)以序列表中SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2为上下游引物，以野生集胞藻PCC6803基因组为模板；以序列表中SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4为上下游引物，以Genbank登录号为U02439.1的大肠杆菌为模板；以序列表中SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6为上下游引物，以野生集胞藻PCC6803为模板，通过PCR扩增技术获得光感启动子兼上游臂基因序列Promoter-up、终止子T1T2基因片段与下游臂序列downstream。获得序列如序列表中SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13所示；

[0014] (2)对步骤(1)中所获得的光感启动子兼上游臂基因序列Promoter-up进行ApaI酶切处理，对步骤(1)中所获得终止子T1T2基因片段进行PSt I和BamHI双酶切，对步骤(1)中所获得的下游臂序列downstream进行Sac I与Sac II双酶切；

[0015] (3)将pBluescript SK质粒进行进行PSt I和BamHI双酶切，与步骤(2)制得的终止子T1T2基因片段用T4连接酶连接，得到质粒pBluescriptSKT1T2；

[0016] 然后将步骤(2)制得的downstream基因片段用Sac I与Sac II双酶切后与经相同酶切的质粒pBluescriptSKT1T2连接，得到质粒P5ST1T2-downstream，结构图如图1所示；

[0017] (5)用限制性内切酶BamHI处理puc4K质粒回收获得Kana抗性序列，序列如序列表中SEQ ID NO:14所示；

[0018] (6)以序列表中SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8为上下游引物，以步骤2回收所得的序列为模板，通过PCR扩增技术获得Kana启动子与Kana抗性基因序列:Promote-Kana，通过引

物在Promote-Kana上下游两端分别添加酶切位点BamHI与NheI,获得序列如序列表中SEQ ID NO:15所示;

[0019] (7),以序列表中SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10为上下游引物,以步骤2回收所得的序列为模板,通过PCR扩增技术获得Kana终止子基因序列:terminator,通过引物在terminator上下游两端分别添加酶切位点Nhe I与BamHI,获得序列如序列表中SEQ ID NO:16所示;

[0020] (8),用限制性内切酶BamHI处理质粒载体PUC18,将步骤(6)与步骤(7)所获得的序列在重组酶的作用下连接至酶切纯化回收所得的PUC18质粒中,得到T载质粒puc18-Kana;

[0021] (9),用限制性内切酶BamHI处理质粒载体P5ST1T2-downstream与T载质粒puc18-Kana,将酶切T载质粒puc18-Kana所获得的Pro-Kana-Nhe I-terminator片段在连接酶的作用下连接至回收所得的P5ST1T2-downstream载体上,制得可穿梭表达的通用质粒载体命名为P5ST1T2Kana,结构图如图2所示。

[0022] (10),以序列表中SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18为上下游引物,以GenBank数据库中里氏木霉(Trichoderma reesei QM9414)的相应基因序列为模板,通过PCR技术获得纤维素外切酶CBH II基因片段,并且通过引物在目的基因两端添加同源臂序列,序列如序列表中SEQ ID NO:19所示,用限制性内切酶Nhe I处理通用质粒P5ST1T2Kana,将所获得的纤维素外切酶CBH II基因片段在重组酶的作用下进行同源重组,制得重组表达载体质粒PSKC II,结构图如图3所示。通过自然转化法将重组表达载体质粒PSNC II转化至集胞藻PCC6803中,得到工程藻株集胞藻PSKC II。

[0023] 一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中串联表达的通用质粒通过上述方法构建得到,一株可产生纤维素酶的集胞藻工程藻株PSKC II通过上述方法得到。

[0024] 根据本发明优选的,所述步骤中,扩增引物核苷酸序列如下:

[0025] SEQ ID NO:1:Promotor-F:5'-GATGTCGACGCTTTAGCGTTCCAGTG-3';

[0026] SEQ ID NO:2:Promotor-R:5'-CATTTGGTTATAATTCCTTATGTAT-3';

[0027] SEQ ID NO:3:TIT2-F:5'-ATACTGCAGCCAAGCTTGGCTGTTTTGGC-3';

[0028] SEQ ID NO:4:TIT2-R:5'-TTAGGATCCCCCATTATTGAAGCATTTAT-3';

[0029] SEQ ID NO:5:downstream-F:5'-CTTCATATGCCGCGGATGACAACGACTCTCCAAC-3';

[0030] SEQ ID NO:6:downstream-R:5'-AGTGAGCTCTTAACCGTTGACAGCAGG-3';

[0031] SEQ ID NO:7:

[0032] Pro-Kana-F:5'-CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG-3';

[0033] SEQ ID NO:8:

[0034] Pro-Kana-R:5'-CCAATTCTGAGGCTAGCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTG-3';

[0035] SEQ ID NO:9:

[0036] Terminator-F:5'-GAGTTTTTCTAAGCTAGC TCAGAATTGGTTAATTGGT-3'

[0037] SEQ ID NO:10:

[0038] Terminator-R:5'-GAGCTCGGTACCCGGGGATCCAAAACGACGGCCAGTGAATT-3'

[0039] SEQ ID NO:17:

[0040] Kana-CBH II-F:5'-GATGAGTTTTTCTAAGCTAGCATGCAAGCTTGCTCAAGCGT-3'

[0041] SEQ ID NO:18：

[0042] Kana-CBH II-R:5’-ATTAACCAATTCTGAGCTAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTG-3’

附图说明

[0043] 图1为质粒P5ST1T2-downstream结构图；

[0044] 图2为通用质粒P5ST1T2Kana结构图；

[0045] 图3为重组表达载体PSKC II结构图；

[0046] 图4为重组表达载体PSKC II PCR扩增检测图；

[0047] 图5为工程藻株酶活对比图。

[0048] 本发明对于现有的技术，具有如下的优点及效果：

[0049] 本发明在启动子-Kana基因与终止子基因中间添加酶切位点Nhe I，通过将重构后的Kana基因重组整合至含有集胞藻同源臂的质粒P5ST1T2-downstream中得到一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC6803中串联表达的通用质粒P5ST1T2Kana。本发明另一个目的是提供一种利用Kana抗性基因启动子启动纤维素酶CBH II在集胞藻PCC6803表达的基因工程藻，实现纤维素酶CBH II的光合生物生产新方法。

具体实施方式

[0050] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。本发明实施例中使用的集胞藻PCC6803野生型藻株由山东农科院惠赠。

[0051] 实施例1

[0052] 质粒P5ST1T2-downstream的构建：

[0053] (1)以序列表中SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2为上下游引物，以野生集胞藻PCC6803基因组为模板；以序列表中SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4为上下游引物，以Genbank登录号为U02439.1的大肠杆菌为模板；以序列表中SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6为上下游引物，以野生集胞藻PCC6803为模板，通过PCR扩增技术获得光感启动子兼上游臂基因序列Promoter-up、终止子T1T2基因片段与下游臂序列downstream。获得序列如序列表中SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13所示；(2)对步骤(1)中所获得的光感启动子兼上游臂基因序列Promoter-up进行ApaI酶切处理，对步骤(1)中所获得终止子T1T2基因片段进行PSt I和BamHI双酶切，对步骤(1)中所获得的下游臂序列downstream进行Sac I与Sac II双酶切；(3)将pBluescript SK质粒进行进行PSt I和BamHI双酶切，与步骤(2)制得的终止子T1T2基因片段用T4连接酶连接，得到质粒pBluescriptSKT1T2；然后将步骤(2)制得的downstream基因片段用Sac I与Sac II双酶切后与经相同酶切的质粒pBluescriptSKT1T2连接，得到质粒P5ST1T2-downstream，结构图如图1所示。

[0054] 本实施例中所用酶切体系如下：DNA 3μL，内切酶1μL，10×Buffer1μL，ddH2O 5μL，酶切温度为30℃，酶切时间为2h；PCR体系如下：上下游引物各1μL，模板1μL，重组酶12.5μL，ddH2O 9.5μL，总体系共25μL，将反应组分加入PCR管中进行PCR扩增，扩增程序为：预变性，94℃，3min；变性，98℃，10s；退火，温度55℃，时间为15s；延伸，72℃，每扩增1kbDNA需1min；循环，变性-退火-延伸的循环30个；72℃，5min；4℃，10min；连接体系如下：回收获得的基因片段0.5μL，内切酶处理后的质粒片段2.5μL，T4连接酶1μL，10×Buffer 1μL，ddH2O 5μL，总

体系10μL,反应温度为16℃,连接10h。经过以上实施例获得质粒P5ST1T2-downstream。

[0055] 实施例2

[0056] 通用质粒P5ST1T2Kana的构建

[0057] (1)用限制性内切酶BamHI处理puc4K质粒回收获得Kana抗性序列,序列如序列表中SEQ ID NO:14所示;(2)以序列表中SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8为上下游引物,以步骤(1)回收所得的序列为模板,通过PCR扩增技术获得启动子与Kana抗性基因序列:Promote-Kana,通过引物在Promote-Kana上下游两端分别添加酶切位点BamHI与Nhe I,获得序列如序列表中SEQ ID NO:15所示;以序列表中SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10为上下游引物,以步骤2回收所得的序列为模板,通过PCR扩增技术获得终止子基因序列:terminator,通过引物在terminator上下游两端分别添加酶切位点Nhe I与BamHI,获得序列如序列表中SEQ ID NO:16所示;

[0058] 本实施例中所用酶切体系如下:DNA 3μL,内切酶1μL,10×Buffer1μL,ddH2O 5μL,酶切温度为30℃,酶切时间为2h;PCR体系如下:上下游引物各1μL,模板1μL,重组酶12.5μL,ddH2O 9.5μL,总体系共25μL,将反应组分加入PCR管中进行PCR扩增,扩增程序为:预变性,94℃,3min;变性,98℃,10s;退火,温度55℃,时间为15s;延伸,72℃,每扩增1kbDNA需1min;循环,变性-退火-延伸的循环30个;72℃,5min;4℃,10min;重组连接体系如下:回收获得的纤维素外切酶CBH II基因1μL,回收获得的Promoter-up0.5μL,ApaI处理后的P5ST1T2npt质粒2.5μL,重组酶2μL,10×Buffer4μL,ddH2O10μL,总体系20μL,反应温度37℃,反应时间2h。经过以上实施例获得通用质粒P5ST1T2Kana。

[0059] 实施例3

[0060] 集胞藻中表达纤维素酶的重组质粒PSKC II的构建

[0061] 以序列表中SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18为上下游引物,以GenBank数据库中里氏木霉(Trichoderma reesei QM9414)的相应基因序列为模板,通过PCR技术获得纤维素外切酶CBH II基因片段,并且通过引物在目的基因两端添加同源臂序列,序列如序列表中SEQ ID NO:19所示;用限制性内切酶Nhe I处理可穿梭重组表达载体P5ST1T2Kana,与所获得的纤维素外切酶CBH II基因片段在重组酶的作用下进行同源重组,制得重组表达载体质粒PSKC II。

[0062] 实施例4

[0063] 可产生纤维素酶的集胞藻工程藻株PSKC II的构建与酶活测定

[0064] 通过自然转化法将重组表达载体质粒PSNC II转化至集胞藻PCC6803中,29℃,180rpm,1400Lux连续光照扩大培养得工程藻株PSKC II。将野生型集胞藻PCC6803和工程藻株PSKC II接种于50mlBG-11液体培养基中,调节OD_{730}=0.2,于29℃,1400Lux持续光照条件下振荡培养(150rpm)至对数生长期,取30mL处于对数期的藻液,6000rpm离心7min,去上清,用20mL50mmol/L pH5.0的醋酸钠缓冲液重悬藻泥,6000rpm离心7min,去上清,收集藻细胞,收集的藻细胞经液氮研磨、超声破碎后制备成粗酶液。

[0065] nNPC法测定酶活。酶活测定结果如附图5所示

[0066] 通过酶活测定结果表明集胞藻工程藻株PSKC II酶活明显高于野生集胞藻藻株酶活,此结果证明本发明中一种利用Kana抗性基因启动子启动目的基因在集胞藻PCC 6803中串联表达的通用质粒可在集胞藻中表达外源基因,并且本发明以此质粒获得一株可产生纤

维素酶的集胞藻藻株。

SEQ ID NO:1：Promotor-F:5’-GATGTCGACGCTTTAGCGTTCCAGTG-3’；

SEQ ID NO:2：Promotor-R:5’-CATTTGGTTATAATTCCTTATGTAT-3’；

SEQ ID NO:3：TIT2-F:5’-ATACTGCAGCCAAGCTTGGCTGTTTTGGC-3’；

SEQ ID NO:4：TIT2-R:5’-TTAGGATCCCCCATTATTGAAGCATTTAT-3’；

SEQ ID NO:5：downstream-F:5’-CTTCATATGCCGCGGATGACAACGACTCTCCAAC-3’；

SEQ ID NO:6：downstream-R:5’-AGTGAGCTCTTAACCGTTGACAGCAGG-3’；

SEQ ID NO:7：

Pro-Kana-F: 5’-CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG-3’；

SEQ ID NO:8：

Pro-Kana-R: 5’-CCAATTCTGAGGCTAGCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTG-3’；

SEQ ID NO:9：

Terminator-F：5’-GAGTTTTTCTAAGCTAGC TCAGAATTGGTTAATTGGT-3’

SEQ ID NO:10：

Terminator-R：5’-GAGCTCGGTACCCGGGGATCCAAAACGACGGCCAGTGAATT-3’

SEQ ID NO:11：

[0001] GCTTTAGCGTTCCAGTGGATATTTGCTGGGGGTTAATGAAACATTGTGGCGGAACCCAGGGACAATGTGACCAAA AAATTCAGGGATATCAATAAGTATTAGGTATATGGATCATAATTGTATGCCCGACTATTGCTTAAACTGACTGACCACT GACCTTAAGAGTAATGGCGTGCAAGGCCCAGTGATCAATTTCATTATTTTTCATTATTTCATCTCCATTGTCCCTGAAA ATCAGTTGTGTCGCCCCTCTACACAGCCCAGAACTATGGTAAAGGCGCACGAAAAACCGCCAGGTAAACTCTTCTCAAC CCCCAAAACGCCCTCTGTTTACCCATGGAAAAAACGACAATTACAAGAAAGTAAAACTTATGTCATCTATAAGCTTCGT GTATATTAACTTCCTGTTACAAAGCTTTACAAAACTCTCATTAATCCTTTAGACTAAGTTTAGTCAGTTCCAATCTGAA CATCGACAAATACATAAGGAATTATAACCAA

SEQ ID NO:12：

TAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAG ATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCA TGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGC ATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAG TAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAA ACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTTTATTT TTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATGGGGGA

SEQ ID NO:13：

ATGACAACGACTCTCCAACAGCGCGAAAGCGCTTCCTTGTGGGAACAGTTTTGTCAGTGGGTGACCTCTACCAAC AACCGGATTTATGTCGGTTGGTTCGGTACCTTGATGATCCCCACCCTCTTAACTGCCACCACTTGCTTCATCATTGCCT TCATCGCCGCTCCCCCCGTTGACATCGACGGTATCCGTGAGCCCGTTGCTGGTTCTTTGCTTTACGGTAACAACATCAT CTCTGGTGCTGTTGTACCTTCTTCCAACGCTATCGGTTTGCACTTCTACCCCATCTGGGAAGCCGCTTCCTTAGATGAG TGGTTGTACAACGGTGGTCCTTACCAGTTGGTAGTATTCCACTTCCTCATCGGCATTTTCTGCTACATGGGTCGTCAGT GGGAACTTTCCTACCGCTTAGGTATGCGTCCTTGGATTTGTGTGGCTTACTCTGCCCCCGTATCCGCTGCCACCGCCGT ATTCTTGATCTACCCCATTGGTCAAGGCTCCTTCTCTGATGGTATGCCCTTGGGTATTTCTGGTACCTTCAACTTCATG ATCGTGTTCCAAGCTGAGCACAACATCCTGATGCACCCCTTCCACATGTTAGGTGTGGCTGGTGTATTCGGTGGTAGCT TGTTCTCCGCCATGCACGGTTCCTTGGTAACCTCCTCCTTGGTGCGTGAAACCACCGAAGTTGAATCCCAGAACTACGG

TTACAAATTCGGTCAAGAAGAAGAAACCTACAACATCGTTGCCGCCCACGGCTACTTTGGTCGGTTGATCTTCCAATAT
GCTTCTTTCAACAACAGCCGTTCCTTGCACTTCTTCTTGGGTGCTTGGCCTGTAATCGGCATCTGGTTCACTGCTATGG
GTGTAAGCACCATGGCGTTCAACCTGAACGGTTTCAACTTCAACCAGTCCATCTTGGATAGCCAAGGCCGGGTAATCGG
CACCTGGGCTGATGTATTGAACCGAGCCAACATCGGTTTTGAAGTAATGCACGAACGCAATGCCCACAACTTCCCCCTC
GACTTAGCGTCTGGGGAGCAAGCTCCTGTGGCTTTGACCGCTCCTGCTGTCAACGGTTAA

SEQ ID NO：14：

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCCCCGGATCCGTCGACCTGCAGGGGGGGGGGGGAAAGCCACGTT
GTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAA
ACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGA
TGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAG
CCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAA
ACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCAC
TGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCA
GTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCGTCTCGCTCAGG
CGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGT
CTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTT
ATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCA
TCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGA
TATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAG
AGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCA
TCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAAGTTCAAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTC
[0002] ATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTCAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCAC
GAGGCAGACCTCAGCGCCCCCCCCCCCCTGCAGGTCGACGGATCCGGGGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT
GACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTAC
GCATCTGTGCGGTATTTCACA

SEQ ID NO：15：

GGATCCCAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCCCCGGATCCGTCGACCTGCAGGGGGGGGGGGGAAAGC
CACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTT
ACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAA
CATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTAT
GGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCA
GACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACT
CACCACTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCG
CTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCGTCTCG
CTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGA
ACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGAT
AACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATC
TTGCCATCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAA
TCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGCTAGC

SEQ ID NO：16

GCTAGCTCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTT
GAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCA

AAAGTTCAAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGAT
GGGGCGATTCAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGCCCCCCCCCCCCTGCAGGTC
GACGGATCCGGGGAATTCACTGGCCGTCGTTTTGGATCC

SEQ ID NO:17：

Kana- CBHⅡ-F: 5'-GATGAGTTTTTCTAAGCTAGCATGCAAGCTTGCTCAAGCGT-3'

SEQ ID NO:18:

Kana- CBHⅡ-R：5'-ATTAACCAATTCTGAGCTAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTG-3'

SEQ ID NO:19:

[0003] GCTAGCATGCAAGCTTGCTCAAGCGTCTGGGGCCAATGTGGTGGCCAGAATTGGTCGGGTCCGACTTGCTGTGCT
TCCGGAAGCACATGCGTCTACTCCAACGACTATTACTCCCAGTGTCTTCCCGGCGCTGCAAGCTCAAGCTCGTCCACGC
GCGCCGCGTCGACGACTTCTCGAGTATCCCCCACAACATCCCGGTCGAGCTCCGCGACGCCTCCACCTGGTTCTACTAC
TACCAGAGTACCTCCAGTCGGATCGGGAACCGCTACGTATTCAGGCAACCCTTTTGTTGGGGTCACTCCTTGGGCCAAT
GCATATTACGCCTCTGAAGTTAGCAGCCTCGCTATTCCTAGCTTGACTGGAGCCATGGCCACTGCTGCAGCAGCTGTCG
CAAAGGTTCCCTCTTTTATGTGGCTAGATACTCTTGACAAGACCCCTCTCATGGAGCAAACCTTGGCCGACATCCGCAC
CGCCAACAAGAATGGCGGTAACTATGCCGGACAGTTTGTGGTGTATGACTTGCCGGATCGCGATTGCGCTGCCCTTGCC
TCGAATGGCGAATACTCTATTGCCGATGGTGGCGTCGCCAAATATAAGAACTATATCGACACCATTCGTCAAATTGTCG
TGGAATATTCCGATATCCGGACCCTCCTGGTTATTGAGCCTGACTCTCTTGCCAACCTGGTGACCAACCTCGGTACTCC
AAAGTGTGCCAATGCTCAGTCAGCCTACCTTGAGTGCATCAACTACGCCGTCACACAGCTGAACCTTCCAAATGTTGCG
ATGTATTTGGACGCTGGCCATGCAGGATGGCTTGGCTGGCCGGCAAACCAAGACCCGGCCGCTCAGCTATTTGCAAATG
TTTACAAGAATGCATCGTCTCCGAGAGCTCTTCGCGGATTGGCAACCAATGTCGCCAACTACAACGGGTGGAACATTAC
CAGCCCCCCATCGTACACGCAAGGCAACGCTGTCTACAACGAGAAGCTGTACATCCACGCTATTGGACCTCTTCTTGCC
AATCACGGCTGGTCCAACGCCTTCTTCATCACTGATCAAGGTCGATCGGGAAAGCAGCCTACCGGACAGCAACAGTGGG
GAGACTGGTGCAATGTGATCGGCACCGGATTTGGTATTCGCCCATCCGCAAACACTGGGGACTCGTTGCTGGATTCGTT
TGTCTGGGTCAAGCCAGGCGGCGAGTGTGACGGCACCAGCGACAGCAGTGCGCCACGATTTGACTCCCACTGTGCGCTC
CCAGATGCCTTGCAACCGGCGCCTCAAGCTGGTGCTTGGTTCCAAGCCTACTTTGTGCAGCTTCTCACAAACGCAAACC
CATCGTTCCTGCACCACCACCACCACCACTAAGCTAGC

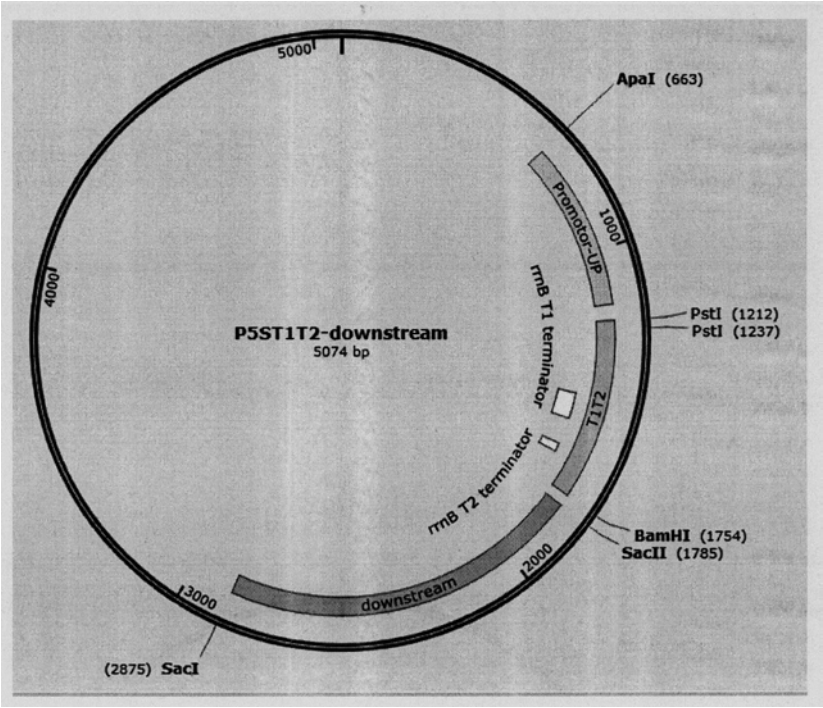

5000
ApaI (663)
Promotor-UP
1000
4000
rrnB T1 terminator
PstI (1212)
PstI (1237)
P5ST1T2-downstream
5074 bp
T1T2
rrnB T2 terminator
BamHI (1754)
SacII (1785)
2000
3000
downstream
(2875) SacI

图1

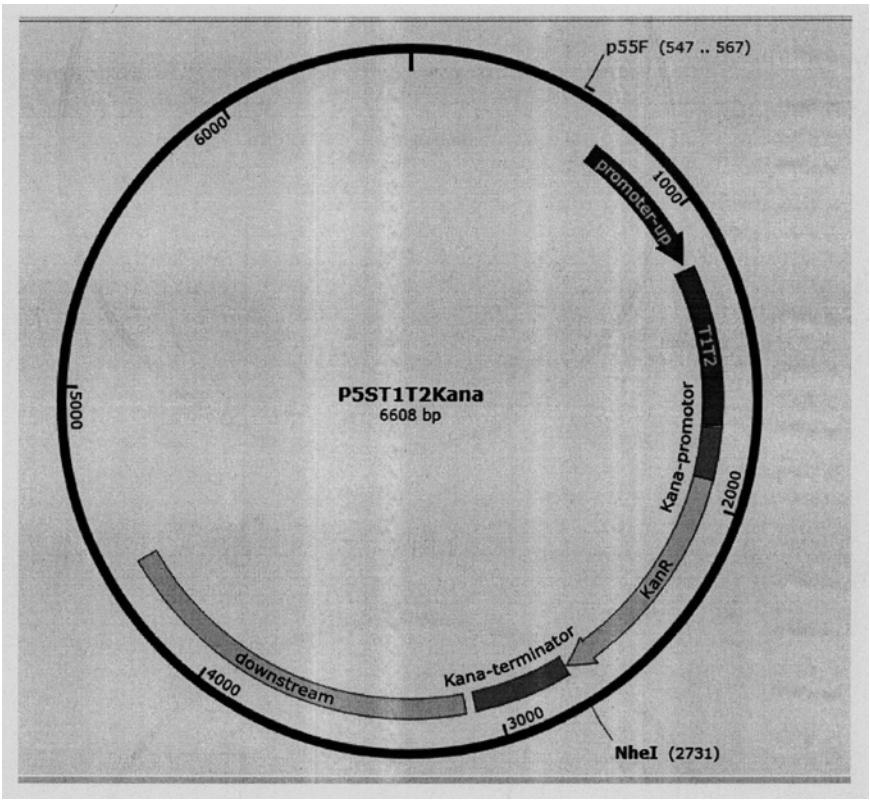

p55F (547 .. 567)
6000
promoter-up
1000
T1T2
P5ST1T2Kana
6608 bp
Kana-promotor
5000
2000
KanR
Kana-terminator
downstream
4000
3000
NheI (2731)

图2

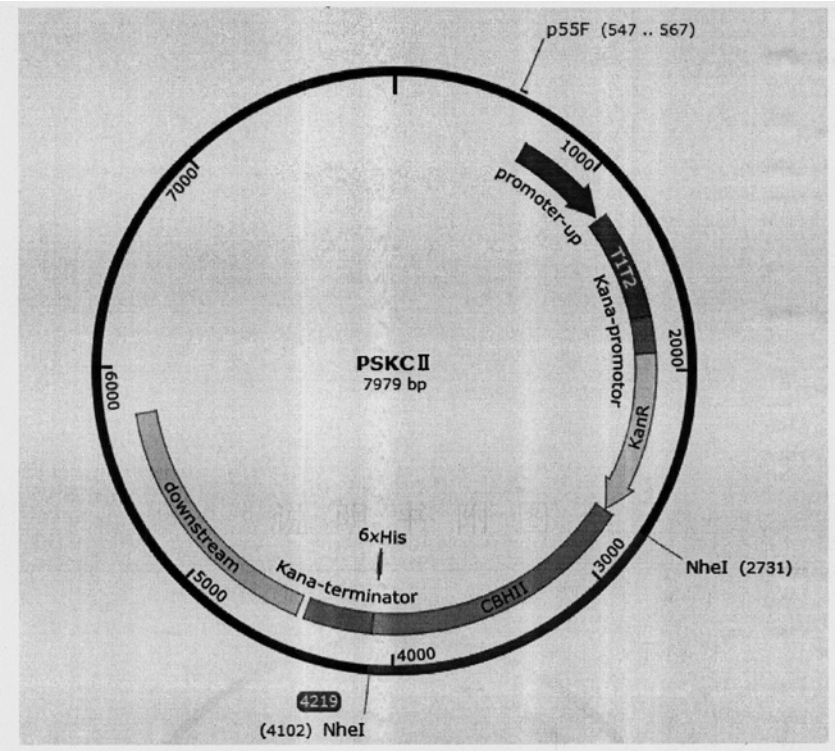

p55F (547 .. 567)
1000
promoter-up
T1T2
Kana-promotor
2000
KanR
PSKCⅡ
7979 bp
7000
6000
downstream
5000
6xHis
Kana-terminator
CBHII
3000
NheI (2731)
4000
4219
(4102) NheI

图3

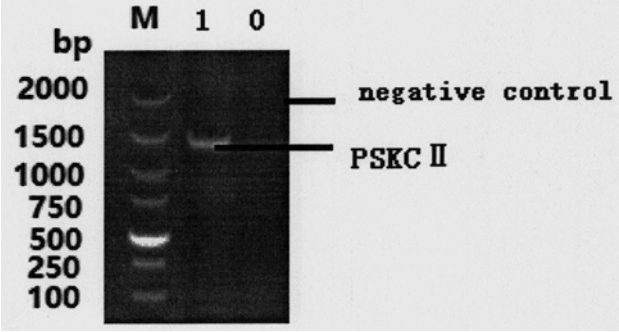

M 1 0
bp
2000
1500
1000
750
500
250
100
negative control
PSKC Ⅱ

图4

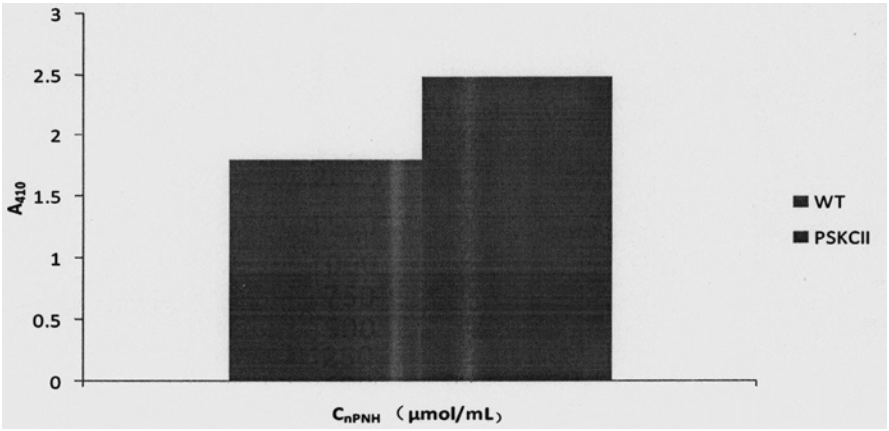


图5