

phbB 基因在莱茵衣藻中的表达与分子检测

王潮岗^① 胡章立^{①*} 胡 炜^② 雷安平^①

(^①深圳大学生命科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 518060; ^②淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072.)

* 联系人, E-mail: huzl@szu.edu.cn

摘要 通过构建依赖 NADPH 的乙酰乙酰 CoA 还原酶基因(*phbB*)的衣藻表达载体, 用石英砂 VOTEX 转化技术, 将 *phbB* 基因导入细胞壁缺陷的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* cc-849)中, 用含有 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 Zeomycin 的平板培养基进行筛选和实验室保持培养, 得到了表达 *phbB* 基因的转基因藻株. PCR 和 Southern blot 结果显示 *phbB* 基因已整合到莱茵衣藻基因组中. RT-PCR 与 DNA 杂交的检测结果显示, 导入的 *phbB* 基因在衣藻中具有转录活性.

关键词 转基因衣藻 *phbB* 基因 聚- β -羟基丁酸(PHB)

化学合成塑料广泛应用带来的问题之一就是“白色污染”. 研究表明, 在自然界中, 化学合成塑料不易被土壤中的微生物所降解, 对环境有一定的污染^[1]. 因此, 生物可降解塑料越来越受到人们的关注. 聚- β -羟基丁酸(polyhydroxybutyric acid, PHB)是发现最早且研究最透彻的一种生物可降解塑料, 它不仅具有与化学合成塑料相似的理化性质, 还具有一些特殊性能, 如生物可降解性、生物相容性、光学活性、无毒性、无刺激性、无免疫原性等^[2,3]. 通过细菌发酵法生产 PHB 需要昂贵的底物使其价格难以下降, 无法和现今价格低廉的化学合成塑料竞争. 通过基因工程的方法, 将 PHB 生物合成的关键酶基因转入受体生物, 通过转基因生物生产 PHB 是解决白色污染的有效途径. 1992 年, Poirier 等人^[4]进行了植物生产 PHB 的尝试, 现在拟南芥等植物已获成功. 但转基因植物生产 PHB 存在生长周期长以及 PHB 在转基因植物中的含量达不到商业化生产要求^[5]的缺点. 另外, 由于“基因逃逸”现象, 转基因植物也会给自然环境的安全带来压力. 衣藻素有“光合酵母”之称, 其生长速率快, 生长周期短, 遗传背景清楚, 是理想的转基因植物受体. 以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)作为受体材料, 将合成 PHB 的相关酶基因导入衣藻中, CO_2 (碳源)和太阳能(能源)给衣藻的 PHB 生物合成提供丰富的合成底物-乙酰-CoA, 从而使 PHB 颗粒在衣藻中累积, 为实现工业化生产 PHB 开辟新的道路.

在衣藻中合成 PHB 意义重大, 但国内外尚无相关文献报道. PHB 在生物体内的合成涉及到 3 个关键酶, 即 3-酮硫裂解酶、依赖 NADPH 的乙酰乙酰-CoA 还原酶和 PHB 合成酶, 分别由 *phbA*, *phbB* 和 *phbC*

基因编码. 本实验室建立一套外源基因在莱茵衣藻中的表达体系. 通过构建衣藻外源基因表达载体, 将 *phbB* 基因导入衣藻中, 经分子检测证实基因已整合到衣藻基因组中, 并在转录水平得到表达. 这为进一步将 PHB 生物合成的另 2 个关键酶基因(*phbA*, *phbC*)导入衣藻打下了良好的基础.

1 材料与方法

(i) 实验材料. 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* cc-849)由美国 Duke 大学 *Chlamydomonas* 遗传中心提供, 在 Tris-acetate-phosphate(TAP)^[6]培养基中培养保存. 大肠杆菌菌株 *E. coli* XL₁, 质粒 p105(含衣藻 *RBCS2* 启动子和终止子), 质粒 p124(带有 *ble* 基因, 使宿主细胞具有腐霉菌素和 Zeomycin 抗性)均为本实验室保存; pUB8(含 *phbB* 基因)由中国科学院植物研究所宋艳茹教授惠赠.

(ii) 实验试剂. 各种限制性内切酶、T4 连接酶、Klenow 片段、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase)、质粒纯化试剂盒、PCR 片段回收试剂盒、RT-PCR 反应试剂盒等均购自 TaKaRa 生物(大连)有限公司, PCR 引物由上海生工生物工程公司合成, 快速 DNA 连接试剂盒、高效地高辛 DNA 标记和检测试剂盒均购自 Roche 生物公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司.

(iii) 衣藻的核酸提取. 衣藻总 DNA 提取参照文献^[7]的方法. 取 10 mL 处于对数生长后期的衣藻培养液, 4℃离心收集, 加 350 μL NET(0.1 mol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)重悬沉淀, 加入 25 μL 10 mg/mL 的蛋白酶 K(Proteinase K)及 25 μL 20% SDS, 混匀并于 55℃水浴 2 h. 冰上冷却, 加

入 200 μL 5 mol/L KAc, 冰上静置后离心, 上清加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 2 次, 再用等体积的氯仿抽提 1 次, 水相加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后置于 -70°C 放置 15 min; 离心收集沉淀, 70%乙醇洗涤沉淀, 干燥后溶于 30 μL TE 缓冲液中. 衣藻总 RNA 的提取采用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂盒, 所有操作均参照试剂盒使用说明书.

(iv) 莱茵衣藻“珠磨法”遗传转化. 莱茵衣藻 cc-849 的遗传转化采用珠磨法^[8], 具体步骤如下: (1) 莱茵衣藻 cc-849 在 TAP 培养液中培养至对数期, 细胞数约为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞/mL, 室温离心收集, 重悬, 调整细胞浓度至 2×10^8 个细胞/mL; (2) 吸取 300 μL 悬浮液到 5 mL 的试管里(内含已灭菌的石英砂), 目的 DNA 酶切成线状, 取 1 μg 加入试管, cc-849/石英砂/外源 DNA 混合物快速振荡 15 秒; (3) 把混合液转移到 25 mL 的带螺旋帽的离心管中, 加入 10 mL 灭菌 TAP 培养液, 在 100 r/min 摇床过夜培养; (4) 室温离心收集细胞, 去上清, 用 0.5 mL TAP 重悬, 加入 3.5 mL 0.5% TAP 培养基, 混匀后倒在 TAP 平板上(含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Zeomycin), 22°C 光照培养箱里培养 3~4 周, 平板上长出绿色的单克隆藻.

(v) 转基因衣藻的 PCR-Southern blot. 以转基因衣藻总 DNA 为模板, 按 *phbB* 基因序列设计一对引物(扩增片段约 780 bp)(P1: 5'-TGACCATGACTCAGCGCATTTG-3'; P2: 5'-AGGCAAGCTTGTCAGCCCATATG-3')^[9]. 采用的 PCR 反应程序为: 94°C 变性 1 min; 94°C , 1 min, 56°C , 1 min, 72°C , 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min. 取 10 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 采用“向上毛细管转移法”转膜^[10], 然后与 *phbB* 基因探针杂交. 杂交时采用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pUB8 获取的 *phbB* 基因, 按试剂盒说明书用地高辛标记后作为分子探针.

(vi) 转基因衣藻的 RT-PCR 与 DNA 杂交分析. 用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂盒提取转基因衣藻的总 RNA. 取 1 μg 作为模板, 采用 TaKaRa 生物(大连)有限公司的 RNA PCR Kit(AMV), 以 P1 和 P2 为引物进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分离后转膜, 再与地高辛标记的 *phbB* 基因探针杂交.

2 结果

2.1 *phbB* 基因衣藻转化载体构建

构建衣藻转化载体需要衣藻外源基因表达的调控元件、筛选标记基因等. 其构建过程如图 1 所示, 构建

好的衣藻转化载体用酶切和 PCR 进行鉴定(图 2).

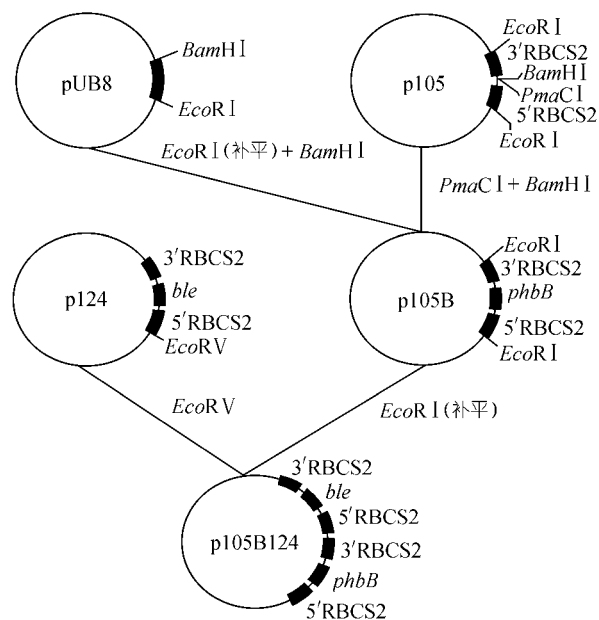


图 1 *phbB* 基因衣藻转化质粒的构建

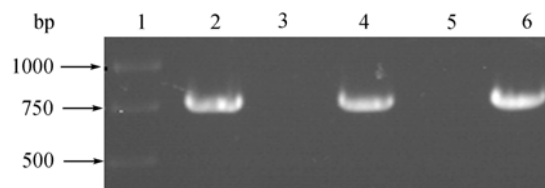


图 2 *phbB* 基因衣藻转化质粒的 PCR 分析

1 示 DL2000 Marker; 2 示阳性对照(pUB8 质粒); 3 和 5 示阴性对照(分别为 p105 和 p124 质粒的 PCR 结果); 4 和 6 示重组质粒 p105B 和 p105B124 的 PCR 分析结果

(i) *phbB* 基因衣藻表达盒的构建. *Eco*R I 酶切 pUB8, Klenow 片段补平, 再加入 *Bam*H I 酶切 1 h, 获得约 780 bp 的 *phbB* 基因, 作为插入片段; 用 *Bam*H I 和 *Pma*C I 双酶切质粒 p105 后经电泳分离, 切胶, 用试剂盒回收 DNA 片段. 将载体和插入片段按 1:3(摩尔比)混合, 加入 T4 连接酶, 16°C 连接过夜. 第 2 天转化感受态大肠杆菌 XL1, 培养 12~16 h 挑选阳性克隆, 用酶切和 PCR 鉴定, 构建好的重组质粒称为 p105B(图 1).

(ii) *phbB* 基因衣藻转化载体的构建. 用 *Eco*R I 酶切 p105B 后用 Klenow 片段补平, 经电泳分离, 切胶, 试剂盒回收 DNA 片段, 获得约 1.8 kb 的插入片段, 包括 *RBCS2* 启动子, *phbB*, *RBCS2* 终止子. *Eco*R V 酶切带有筛选基因 *ble* 的质粒 p124, 去磷酸化处理, 将酶切后的载体和插入片段按 1:3(摩尔比)混合, 加

入 T4 连接酶, 16℃连接过夜. 第 2 天转化感受态大肠杆菌 XL1, 培养 12~16 h 挑选阳性克隆, 用酶切和 PCR 鉴定, 构建好的重组质粒称为 p105B124(图 1).

2.2 转基因衣藻的获得

野生型的莱茵衣藻无法在含 Zeomycin(10 μg/mL) 的平板上生长, 由于 *ble* 基因的转入而使衣藻具有 Zeomycin 抗性^[11]; 通过“珠磨法”^[8]把 *phbB* 基因转入到莱茵衣藻(cc-849)中, 在含有 Zeomycin 的培养基上进行筛选, 挑取单克隆藻, 并在含有 Zeomycin 的平板上保持培养. 为了得到最佳的转化效率, 尝试了环状质粒和不同限制性内切酶处理转化质粒(表 1), 结果表明, 转化 DNA 分子的构象和酶切位点离同源重组片段距离的远近也会影响衣藻的转化效率(同源重组片段为 *RBCS2* 启动子和终止子), 这与 Kindle^[8]取得的结果一致.

表 1 不同酶切处理 *phbB* 基因衣藻转化载体对转化效率的影响

重组质粒状态	酶切处理	PCR 检测 <i>phbB</i> 基因的转化效率(转化效率 = <i>phbB</i> 基因阳性重组子/总重组子)
环状	无	0
线状	<i>Sac</i> I	0
线状	<i>Kpn</i> I	0
线状	<i>Bam</i> H I	30%转基因藻可扩增出 <i>phbB</i> 基因片段(约 780 bp), 但浓度很低
线状	<i>Not</i> I	90%转基因藻可扩增出 <i>phbB</i> 基因片段(约 780 bp), 且浓度高

2.3 转基因衣藻 PCR-Southern blot 分析

以转基因衣藻的总 DNA 为模板, P1 和 P2 序列为引物进行 PCR, 扩增出全段 *phbB* 基因片段(大小约为 780 bp)(图 3), 以地高辛标记的完整的 *phbB* 基因为探针, 进行 PCR-Southern blot 检测, 结果显示扩增片段可与探针杂交, 转基因衣藻在 780 bp 处出现和阳性对照

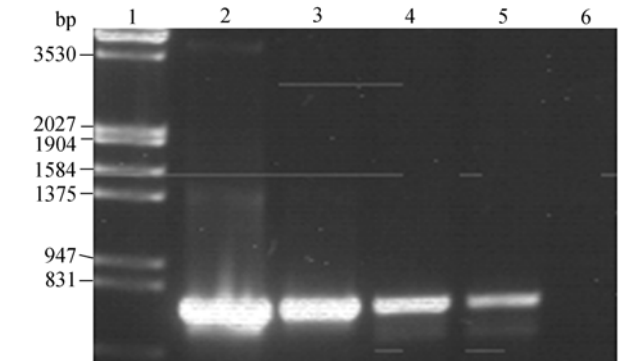


图 3 转 *phbB* 基因衣藻的 PCR 检测
1 示λDNA/*Hind*III Marker; 2 示阳性对照 pUB8; 3~5 示转基因衣藻基因组 DNA 中 *phbB* 的扩增产物; 6 示阴性对照(未转基因衣藻基因组 DNA 的扩增产物)

一致的杂交印迹反应, 而对照组没有反应, 观察不到印迹. 这表明含 *phbB* 基因的转基因衣藻已经获得(图 4).

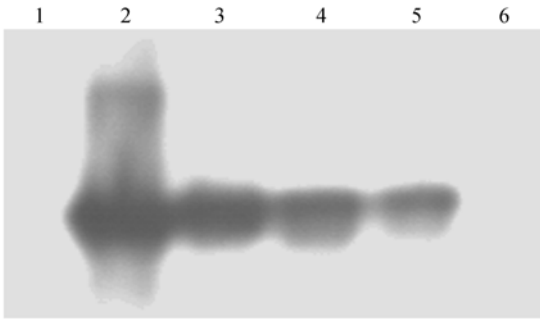


图 4 转 *phbB* 基因衣藻的 PCR-Southern 分析
1 示λDNA/*Hind*III Marker; 2 示阳性对照 pUB8; 3~5 示转 *phbB* 基因衣藻 PCR 产物与 *phbB* 基因探针杂交; 6 示阴性对照(未转化衣藻基因组 DNA 扩增产物与探针杂交)

2.4 转基因衣藻的 RT-PCR-DNA 杂交分析

RBCS2 启动子是来源于衣藻的光诱导型启动子, 在光照条件下培养衣藻就可表达目的基因. 所以光照条件下培养转基因衣藻, 提取衣藻总 RNA, 以反转录合成的 cDNA 第 1 链为模板, P1 和 P2 为引物进行扩增, 得到目的片段(约 780 bp)(图 5), 阳性对照为 pUB8 双酶切得到的 *phbB* 基因. 以 DIG(地高辛)标记的 *phbB* 基因为探针, 进行 Southern blot 分析, 结果都显示出 780 bp 的条带信号(图 6), 表明整合进衣藻基

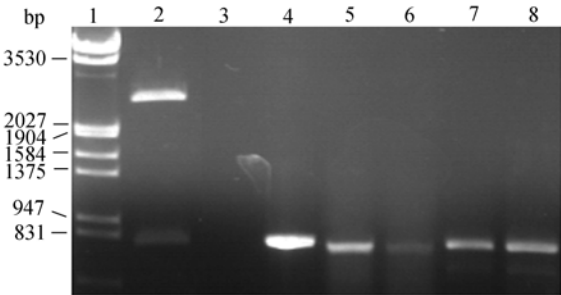


图 5 转 *phbB* 基因衣藻的 RT-PCR 分析
1 示λDNA/*Hind*III+*Eco*R I Marker; 2 示阳性对照(pUB8/*Bam*H I +*Eco*R I); 3 示阴性对照(未转化衣藻总 RNA RT-PCR 结果); 4~8 示转基因衣藻总 RNA 的 RT-PCR 产物

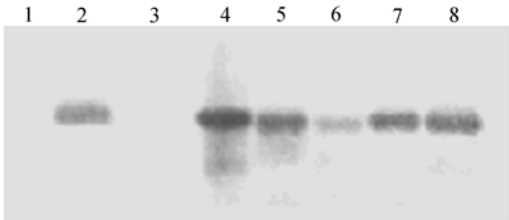


图 6 转 *phbB* 基因衣藻 RT-PCR-DNA 杂交分析
1 示λDNA/*Hind*III+*Eco*R I; 2 示阳性对照(pUB8/*Bam*H I +*Eco*R I); 3 示阴性对照, 未转化衣藻总 RNA RT-PCR 产物与探针杂交结果; 4~8 示转基因衣藻 RT-PCR 产物与 *phbB* 探针杂交结果

因组中的 *phbB* 基因在衣藻细胞中具有转录活性,可在 mRNA 水平进行有效转录,同时结果也显示 *phbB* 基因在莱茵衣藻中表达水平不一致(图 5 和 6)。

3 讨论

莱茵衣藻遗传背景清楚,生长速度快,繁殖周期短,是一种极具潜力的生物反应器^[6]。但由于外源基因转化技术的限制,使得衣藻作为“生物反应器”的研究进展一直不大。近年来,随着衣藻核转化技术和叶绿体转化技术的日益成熟,越来越多的研究者尝试在莱茵衣藻里表达外源基因,已报道的有 *ble*^[11], *aphIII*^[12]和 *hpt*^[13]等。本研究探讨用衣藻作为生物反应器生产 PHB,具有以下几个优点:(i) 衣藻繁殖速度快,生长周期短;(ii) 能象细菌等微生物一样进行集约化生产;(iii) 它可以利用光能来合成生产 PHB 的底物,不需要添加昂贵的底物,大大降低 PHB 生产成本;(iv) 该研究采用没有细胞壁的突变株,表达产物容易分离提取;(v) 生长繁殖在光生物反应系统(photo-bioreactor)中进行,易于控制,不担忧转基因生物的环境生态学问题。

利用衣藻生产 PHB 是个很好的途径,但首先要解决合成 PHB 的关键酶基因在衣藻中稳定表达的问题。许多外源基因导入衣藻后都会出现“基因沉默”或“基因分离”现象,在本研究中发现,经过了半年时间的实验室传代培养,没有出现“基因分离”现象,并通过分子检测证实 *phbB* 基因已经整合到基因组,通过转录过程得到 *phbB* 基因的 mRNA。这说明本研究建立的衣藻外源基因表达系统能正常工作。同时在研究过程中也检测到“基因沉默”藻株,从 RT-PCR 结果可以看出外源基因在衣藻中的表达水平不一致(图 5 和 6),具体原因有待进一步研究。

phbB 基因源于细菌,不具内含子,在 *RBCS2* 启动子和终止子作用下得到了转录,是否具有酶活性还需做进一步检测。为了提高 *phbB* 基因在衣藻中的表达效率,可以在 *phbB* 基因中加入衣藻内含子以帮助该基因的高效表达;也可以通过构建串连启动子来增强外源基因的表达,有研究表明 *HSP70A* 启动子融合到其他启动子的上游时,可明显提高导入基因在衣藻中的表达水平,并减少“基因沉默”现象^[14]。为此,本实验室正在分离新启动子,进一步完善高效的衣藻表达载体,为进一步构建高效生产 PHB 的转基

因藻打下基础;同时正在把 PHB 生物合成途径的另外两个关键酶基因 *phbA* 和 *phbC* 基因导入莱茵衣藻,最终实现在衣藻中合成 PHB。

致谢 本工作为广东省自然科学基金(批准号: 011743)和“淡水生态与生物技术国家重点实验室”开放基金(批准号: 2002FB01)的资助项目。

参 考 文 献

- 1 Reddy C S K, Ghai R, Rashmi, et al. Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresour Technol*, 2003, 87(2): 137~146[DOI]
- 2 Poirier Y, Nawrath C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomes, in bacteria and plants. *Biotechnology(NY)*, 1995, 13(2): 142~150
- 3 许开天, . PHB 在生物医学中的应用研究进展. *应用与环境生物学报*, 1995, 1(1): 85~91
- 4 Poirier Y, Dennis D E, Klomparens K, et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, 103: 237~246[DOI]
- 5 Zhang J Y, Ye L, Song Y R. Obtainment of transgenic tobacco harboring *phbA*, *phbB* and *phbC* genes by twice transformation. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(1): 59~62
- 6 Gorman D S, Levine R P. Cytochrome *f* and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1965, 54: 1665~1669
- 7 张中林, 山松, 范国昌, 等. 丙肝病毒融合抗原基因 NS₃-C 定点整合入衣藻叶绿体基因组的研究. *遗传*, 1999, 21(6): 1~6
- 8 Kindle K L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1228~1232
- 9 谢勇安, 崔晓江, 宋艳茹. *phbB*、*phbC* 基因克隆、序列分析及植物表达载体的构建. *植物学报*, 1995, 37(8): 581~588
- 10 Sambrook J, Fritsch E G, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 492~499
- 11 Stevens D R, Rochaix J D, Purton S. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet*, 1996, 25: 23~30[DOI]
- 12 Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 2001, 277: 221~229[DOI]
- 13 Ladygin V G, Boutanaev A M. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 with the hygromycin phosphotransferase gene as a selectable marker. *Russian Journal of Genetics*, 2002, 38: 1009~1014[DOI]
- 14 Michael S, Christoph F B, Olivier V. Sequence elements within an *HSP70A* promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J*, 2002, 31(4): 445~455[DOI]

(2004-05-28 收稿, 2004-07-05 收修改稿)