

集胞藻 PCC6803 高效基因表达平台的构建与评价

齐凤霞^{1,2}, 谈晓明¹, 吕雪峰^{1,3}

1 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 山东省能源生物遗传资源重点实验室, 山东 青岛 266101

齐凤霞, 谈晓明, 吕雪峰. 集胞藻 PCC6803 高效基因表达平台的构建与评价. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1332-1342.
Qi FX, Tan XM, Lü XF. Construction and evaluation of efficient gene expression platforms in *Synechocystis* sp. PCC6803. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1332-1342.

摘要: 针对蓝细菌代谢工程改造的需求, 成功构建了可以在模式蓝细菌菌株集胞藻 PCC6803 中高效表达外源基因的 3 个基因组整合表达平台, 以及 1 个可以在多株蓝细菌中表达的广宿主穿梭表达平台。该表达平台通过选用集胞藻 PCC6803 中 1,5-二磷酸核酮糖缩化酶/氧化酶的启动子驱动外源基因的表达, 应用“SD-AUG”翻译融合的策略提高外源蛋白翻译效率, 以及加入终止子序列 *Trbc* 以提高转录终止效率, 实现了对外源基因的高效表达。利用 *lacZ* 作为报告基因, 检测了所构建表达平台 pFQ20 在集胞藻中的基因表达效率, 结果显示 β -半乳糖苷酶的活性为 109 Miller。同时, 基于 pFQ20 表达平台在集胞藻 PCC6803 中表达了来自大肠杆菌的硫酸酯酶基因 *tesA'*, 蛋白印迹实验结果显示了硫酸酯酶的成功表达。该表达平台为在蓝细菌中开展遗传研究及基因工程改造提供了有用的遗传工具, 其构建策略为在蓝细菌中构建高效稳定的外源基因表达元件提供了借鉴。

关键词: 蓝细菌, 集胞藻 PCC6803, 基因表达平台, β -半乳糖苷酶, 硫酸酯酶

Received: March 17, 2013; **Accepted:** May 16, 2013

Supported by: Hundred Talents Program of the Chinese Academy of Sciences (No. O91001110A).

Corresponding author: Xuefeng Lü. Tel/Fax: +86-532-80662629; E-mail: lvxf@qibebt.ac.cn

中国科学院“百人计划”(No. O91001110A) 资助。

Construction and evaluation of efficient gene expression platforms in *Synechocystis* sp. strain PCC6803

Fengxia Qi^{1,2}, Xiaoming Tan¹, and Xuefeng Lü^{1,3}

¹ Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Shandong Provincial Key Laboratory of Energy Genetics, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: For metabolic engineering of cyanobacteria, there is an urgent need to construct a group of efficient heterologous gene expression platforms and to evaluate their expression efficiencies. Here we constructed three integrative vectors, the pKW1188-derived pFQ9F, pFQ9R and pFQ20, for integration of heterologous genes into the genome of the model cyanobacteria strain *Synechocystis* sp. strain PCC6803. The pFQ16, an RSF1010-derived broad host range shuttle vector, was constructed for conjugative transfer of genes to various cyanobacteria strains. All the four platforms constructed here applied the *rbc* (encodes Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) and the *rbc* terminator to promote and terminate the gene transcription. Besides, a “Shine-Dalgarno -AUG” fusion translation strategy was used to keep the high protein translation efficiency. Using *lacZ* as a reporter gene, the expression efficiency of pFQ20 was evaluated and showed a strong β -galactosidase expression (109 Miller). Furthermore, the platform pFQ20 was used to express the *E. coli tesA* gene and showed significant protein bands through the Western Blot test. The expression platforms constructed in this study offer useful molecular tools for metabolic engineering of cyanobacteria in the future.

Keywords: cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803, expression vectors, β -Galactosidase, thioesterase

蓝细菌是一种光合原核微生物，可以直接利用太阳能、二氧化碳和水进行生长，并且具有生长速度快、光合作用效率高等优点，因此是一种理想的生物工程宿主，在生物能源、生物制药及生产精细化学品等领域具有广泛的应用前景^[1]。

单细胞蓝细菌菌株集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp. strain PCC 6803) 是研究光合作用机制和蓝藻基因工程的模式生物，可以通过自然转化吸收外源 DNA^[2]，其基因组序列^[3]已经于 1996 年被测定，是第一个基因组全序列被测定的蓝细菌菌株，遗传背景相对其他蓝细菌较为清晰。近年来，通过基因工程改造集胞藻 PCC6803，已经成功生物合成多种高价值分子产品，如天然营养素藻蓝蛋白^[4]及食用香料 β -石竹

烯^[5]等，以及化工产品如聚- β -羟丁酸 (PHB)^[6]、聚左旋乳酸 (PLA) 前体左旋乳酸^[7]、蓝藻胞外多糖 (EPS)^[8]、丙酮^[9]和异戊二烯^[10]等。此外，集胞藻 PCC6803 也是合成生物燃料的模式基因工程宿主，已经成功合成生物乙醇^[11-12]、异丁醇^[13]、中长链脂肪酸^[14-15]、脂肪醇及脂肪烃^[16]等生物燃料产品。

蓝细菌虽然具备可持续生产目的产物的优势，但和传统的生物工程宿主如大肠杆菌相比，蓝细菌对外源基因的表达效率仍然较低，如何使目的基因在蓝藻中得到高效表达是一个关键问题。因此，在蓝细菌中开发和构建高效的基因表达平台，对于蓝细菌代谢工程研究以及提高基因工程蓝细菌的终产物产量具有重要意义。

集胞藻 PCC6803 中的外源基因表达载体分为基因组整合载体和穿梭载体, 可以通过自然转化^[17]或者接合转移^[18-19]的方法将目的基因导入蓝细菌细胞内进行表达。基因组整合载体可以将目的基因乃至整个操纵子通过同源整合的方式整合到蓝藻基因组中, 其优点是表达稳定, 可以克服自主复制质粒不稳定的缺点。而穿梭质粒载体则通过接合转移导入蓝细菌细胞并在细胞质中进行自主复制, 其拷贝数常较低, 但具有在多个藻株内的穿梭表达的优势。

目前已经多个启动子在蓝细菌中得到应用, 如 Susan S. Golden 实验室在聚球藻 PCC7942 外源基因表达平台中使用了光合系统 II D1 蛋白基因 *psbA2* 的启动子 *PpsbA2*^[20]以及 IPTG 诱导性启动子 *P_{trc}*^[21]。在集胞藻 PCC6803 中得到应用的启动子有 *PpsbA2*^[12,14]、铜离子诱导型启动子 *PpetE*^[22-23]以及镍离子诱导性启动子^[24]等。同时, Huang 等以荧光蛋白基因 *gfp* 为报告基因构建并评估了细菌来源的启动子 *P_{trc}* 和 *P_{tac}* 在集胞藻 PCC6803 中的表达效率^[25]。此外, 1,5-二磷酸核酮糖缩化酶 (RuBisCO) 是蓝细菌体内主要的可溶性蛋白, 因此其启动子 *P_{rbc}* 被认为是一个强启动子并已经成功在聚球藻 PCC6301^[26-27]、鱼腥藻 PCC7120^[28]和聚球藻 PCC7942^[29]中成功应用。然而目前在集胞藻 PCC6803 中使用 *rbc* 启动子表达外源蛋白的报道仅有一例, 2011 年, Liu 等^[14]发表在 PNAS 的文章中克隆了 *rbcL* 基因上游 206 bp 的片段作为启动子表达硫酯酶 Ch FatB2。但是, 使用该长度启动子的突变株 (SD232) 并没有成功表达基因并获得目的产物癸酸和辛酸, 而使用 *PpsbA2* 启动子表达相同基因的突变株

(SD243) 则可以成功合成目的产物, 该结果说明集胞藻 PCC6803 *rbcL* 上游 206 bp 的片段并不能正常发挥启动子的功能。因此本文尝试在集胞藻 PCC6803 中重新克隆不同长度的 *rbc* 启动子, 系统研究其外源基因表达效率, 并为基因工程改造蓝细菌筛选有效的启动子元件。

在集胞藻 PCC6803 中, RuBisCO 的编码基因 *rbcL*、*rbcX* 和 *rbcS* 串联在同一个操纵子上, 由同一个启动子调控表达 (图 1)。Amichay 等^[30]推断出 *rbcL* 上游 250 bp 的区域为 *rbc* 操纵子的启动子元件, 并通过测序和序列分析认为在 *rbcL* 上游-15~-10 区有类似 SD 序列, 并且在翻译起始密码子上游 60 bp 处发现两处类似-10 区和-35 区的序列。

在大肠杆菌的研究表明, SD 序列以及间隔序列 (SD-AUG) 对基因翻译具有重要影响, 改变间隔序列的碱基数目将使得外源蛋白的表达效率发生显著变化^[31-32]。SD-AUG 的距离同样影响外源蛋白在蓝细菌中的翻译, 如 Takeshima 等^[26]在聚球藻 PCC6301 中发现表达产物人类超氧化物歧化酶时, 证明 hSOD 的比酶活随着 SD-AUG 间隔变大而显著降低。Deng 等^[29]在聚球藻 PCC7942 中表达丙酮酸脱羧酶基因 *pdh* 时, 保持了 *rbcLS* 启动子自身的 SD-AUG, 将 *pdh* 基因与启动子自带的 ATG 进行融合表达, 结果证明 PDC 蛋白表达量提高了近 2 倍。而在表达乙醇脱氢酶基因 *adh* 时, 采用的是 *adh* 基因自身的 31 bp 的 SD 序列, 其蛋白表达量则基本不变。由此证明, 使用蓝细菌自身的 SD-AUG 序列更有利于外源基因在蓝细菌中的表达。

转录终止序列可以终止转录及提高基因的

表达效率,在蓝藻中被广泛应用,如 Takeshima 等^[26]在聚球藻 PCC6301 中表达人类超氧化物歧化酶基因 *hSOD* 时使用 *rbc* 启动子,同时在 *hSOD* 基因下游加入 *rbc* 的终止序列。Deng 等^[29]在聚球藻 PCC7942 中串联表达 *pdh* 和 *adh* 两个基因时则在表达元件下游加入了目的基因 *adh* 自带的终止序列。

构建有效的遗传改造工具是基因工程蓝细菌生物合成生物燃料等产品的基础。通过选取强启动子和转录终止序列作为有效的基因表达元件,并采用融合表达策略,本文成功构建了可以在集胞藻 PCC6803 中高效表达外源基因的一组基因组整合表达平台,并同时构建了可以在多株蓝细菌中表达的穿梭表达平台,并且通过 *lacZ* 报告基因测定了表达平台 pFQ20 的表达效率,以及将该表达平台应用于表达大肠杆菌硫酸酯酶基因 *tesA'*。

1 材料与方法

1.1 试剂

邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (ONPG) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国)。其他化学试剂购自 Merck 公司 (德国) 或 Amresco 公司 (美国)。*Taq* DNA 聚合酶和限制性内切酶购自 Fermentas 公司 (加拿大) 或者 TaKaRa 公司 (日本)。用于分子克隆的试剂盒购自 Omega 公司 (美国) 或 TaKaRa 公司 (日本)。DNA 引物在 Sangon 公司 (中国上海) 合成。DNA 分子标记购自 TaKaRa (日本)。

1.2 集胞藻 PCC6803 的培养

菌株在 30 °C 条件下进行连续光照培养 (30 μ E/(m²·s)), 突变株 Syn-FQ20 和对照菌株

Syn-HB1567 在含有 10 mg/L 壮观素的 BG11 中培养。用于测定 β -半乳糖苷酶活性的藻株在装样量为 20 mL 的 50 mL 三角瓶中进行摇床培养,摇动速度为 140 r/min。用于 SDS-PAGE 及 Western blotting 的藻株,在装样量为 300 mL 的 500 mL 三角瓶中进行通气培养。

1.3 质粒和集胞藻突变株的构建

所有引物见表 1。以集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 为模板,以 P1/P2 和 P3/P4 为引物对,PCR 得到长度分别为 0.3 kb 和 0.2 kb 的片段,将这两个片段插入克隆载体 pMD18-T (TaKaRa, 日本),分别得到质粒 pFQ1 和 pFQ2。

以 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切质粒 pFQ1, 回收 0.3 kb 片段;将同样以 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切 pQL4, 用 T4 连接酶将小片段插入到 pQL4 壮观抗性基因 Ω ^[17,19]下游,经过筛选鉴定,得到质粒 pFQ5。同样方法,以 *Sma* I-*Sac* I 酶切 pFQ2, 胶回收 0.2 kb 的片段插入到酶切 pFQ5 中,经筛选得到了质粒 pFQ6。

用 *Hind* III 和 *Sac* I 酶切 pFQ6 切胶回收获得 Ω -*Prbc-Trbc* (2.5 kb) 片段,利用 T4 聚合酶补平后插入质粒 pKW1188SL^[17]的 *Eco*R I 位点,后者系用 *Eco*R I 切开并补平处理;利用特异引物 PCR 鉴定目的片段插入方向,正向克隆命名为 pFQ9F,反向插入的克隆被命名为 pFQ9R (图 2)。同理,将补平后的 Ω -*Prbc-Trbc* 插入穿梭质粒 pRL59EH^[33-34]的 *Hind* III 位点,筛选鉴定后得到穿梭表达平台 pFQ16 (图 1)。

lacZ 基因是以大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 基因组 DNA 为模板,利用引物对 *lacZ*-1/*lacZ*-2 扩增而来,将所得片段插入到 pUC19 质粒,得

到质粒 pQL12; 以集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 为模板, 利用 P5/P6 为引物对进行 PCR 扩增, 得到的 1.3 kb 的 *PrbcL* 片段; 用 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切 pQL12, 胶回收 *lacZ* 基因片段, 插入到 pFQ9F 中, 得到的质粒再用 *Sal* I 和 *Xba* I 酶切, 并用同样酶切 *PrbcL*, 利用 *Sal* I 和 *Xba* I 位点, 将 *Prbc* 替换 1.3 kb 的 *PrbcL*, 得到质粒 pFQ20 (图 1)。

以大肠杆菌 DH5 α 基因组 DNA 为模板, 利用 QLtesA-1/QLtesA-2 为引物, 扩增得到 0.56 kb 的 *tesA*^[35-36], 并用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切后插入到 pET21b, 得到质粒 pQL5; 以 pQL5 为模板, 利用 *tesA*-1/*tesA*-3 为引物, 片段克隆带有 his-tag 的片段 *tesA*'-histag 并插入到 pMD18-T, 得到质粒 pFQ4。利用 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切 pFQ4, 回收

tesA'-histag 并插入到 pFQ20 的相同位点, 得到表达质粒 pFQ25。所有载体构建均经过酶切或者测序验证。将表达质粒按 Williams 和 Zang 等^[17,37]所述的方法转化集胞藻 PCC6803 后, 利用含有 5 mg/L 壮观霉素的 BG11 琼脂平板筛选转化子, 分别得到集胞藻突变株 Syn-FQ20 和 Syn-FQ25。突变株中的外源基因表达元件均通过基因组 PCR 加以验证。

1.4 集胞藻 PCC6803 中 β -半乳糖苷酶活性测定方法

基于 Miller^[38]和 Gao 等^[22]描述的方法略有改动。取生长对数期 (OD_{730} 在 1.2~1.5 之间) 的培养液进行离心后, 将细胞 OD_{730} 统一调整为 1.5。各取 1.5 mL 上述细胞再次离心收集后,

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Purpose of primer
P1	GCGTCGACTCACCATTTGGACAAAACATCAGG	Forward primer for <i>Prbc</i>
P2	GCTCTAGACATCTAGGTCAGTCCTCCATAAACATT	Reverse primer for <i>Prbc</i>
P3	CCCCCGGGTTACAGTTTTGGCAATTAC	Forward primer for <i>Trbc</i>
P4	CGAGCTCTTCCCCACTTAGATAAAAAATCCG	Reverse primer for <i>Trbc</i>
P5	CCTCTAGACATCTAGGTCAGTCCTCCATAAACATT	Forward primer for <i>PrbcL</i>
P6	CCGTCGACCCTTTACCCGCTTACTGCGTCC	Reverse primer for <i>PrbcL</i>
QLtesA-1	ACATATGGCGGACACGTTATTGATTCTGG	Forward primer for <i>tesA</i> '
QLtesA-2	CCTCGAGTGAGTCATGATTACTAAAGGCTGC	Reverse primer for <i>tesA</i> '
tesA-1	GCTCTAGAGCGGACACGTTATTGATTCTGG	Forward primer for <i>tesA</i> '-histag
tesA-3	CCCCCGGGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG	Reverse primer for <i>tesA</i> '-histag
lacZ-1	GCTCTAGAACCATGATTACGGATTCACTGG	Forward primer for <i>lacZ</i>
lacZ-2	TCCCGGGTACTTCTGACACCAAACCAACTG	Reverse primer for <i>lacZ</i>
lacZ-4	TTACTTCTGACACCAAACCAACTGGTAATGGTAGCGACC	Reverse primer for detection of promoter
Ω -260	GCTCACAGCCAAACTATCAGGTCAAG	Forward primer for detection of promoter
0168-2	TTCCAGGCCACATTGTTGTC	Reverse primer to detect the target gene

用 1 mL 的 Z Buffer (60 mmol/L Na_2HPO_4 , 40 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO_4 , 40 mmol/L β -巯基乙醇) 重悬, 依次加入 50 μL 的 0.1% SDS、50 μL 氯仿反应 1 min 使细胞裂解, 再加入 200 μL ONPG (4 g/L) 并转移至 30 $^\circ\text{C}$ 反应 20 min, 加入 500 μL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。反应液于 12 000 r/min 离心 2 min 将细胞碎片及氯仿沉淀到下层, 取 1.2 mL 上清液测定 OD_{420} , 以不含藻细胞的反应液作为空白对照。根据公式 $\text{Miller}=1\ 000\times OD_{420} / (1.5\ \text{mL}\times 20\ \text{min}\times OD_{730})$ 计算 β 半乳糖苷酶活性。

1.5 蛋白印迹法 (Western blotting) 测定外源蛋白的表达

200 mL 的集胞藻培养液离心收集, 用 10 mL 40 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0) 重悬藻细胞, 加入终浓度 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF。在冰水浴中超声破碎细胞, 每超声 30 s 间隔 30 s~1 min, 有效超声时间为 5 min。随后, 5 000 $\times g$ 离心 30 min 去除细胞残渣。得到的蛋白样品经过 SDS-PAGE

和 Western blotting 检测。Western blotting 采用 PVDF 膜 (Roche, 美国)。利用 6 \times His-标签探针标记目的蛋白, 最终使用碱性磷酸酶显色试剂盒 (Amresco, 美国) 进行检测。

2 结果与分析

2.1 基因表达元件的克隆与设计

本实验基于不同长度的 *rbc* 启动子构建了 4 个平台质粒 pFQ9F、pFQ9R、pFQ16 (图 1) 以及 pFQ20 (图 2), 并选择了其中一个平台用 *lacZ* 报告基因比较了与 pHB1567 的驱动活性差异。为保证 *rbc* 启动子对外源蛋白的翻译效率, 本研究采用了一种翻译融合策略, 以保持 *rbc* 启动子的核糖体结合位点 SD 序列以及 SD 序列和 ATG 的间隔序列 (SD-AUG)。通过 PCR 克隆了 *rbc* 启动子, 包涵了 *rbcL* 的 ATG, 并在 ATG 下游插入一个 *Xba* I 位点供外源基因插入, 使得目的基因与 *rbcL* 的 ATG 及酶切位点序列一起融合表达 (图 1)。在克隆表达外源基因时, 需要通过设计

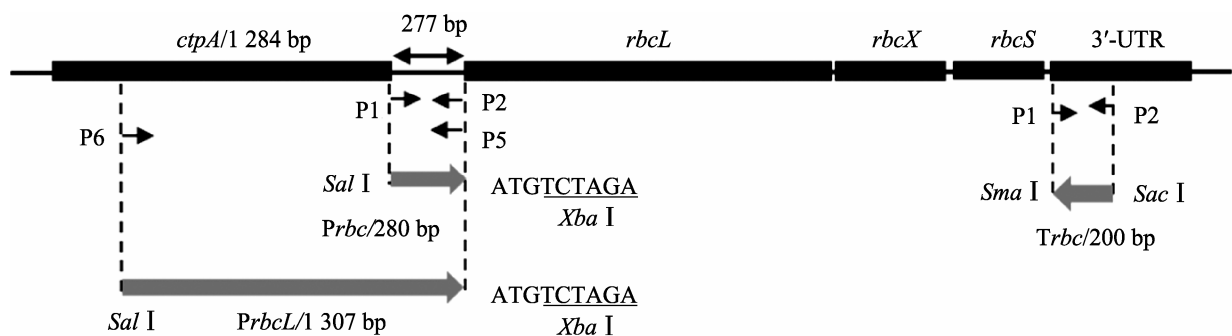


图 1 *rbc* 启动子及终止序列克隆示意图

Fig. 1 Cloning of *rbc* promoter and terminator from the *Synechocystis rbc* operon. *Prbc*: the 280 bp *rbc* promoter; *PrbcL*: the 1 307 bp *rbc* promoter; *Trbc*: *rbc* terminator in *Synechocystis*; ATG: start codon; *Xba* I, *Sal* I, *Sac* I, *Sma* I: the enzyme restriction sites flanked the promoter and terminator fragments. The PCR primers are shown in the figure. *Prbc* and *PrbcL* were cloned with the start codon of *rbcL* and carrying an *Xba* I restriction site downstream ATG.

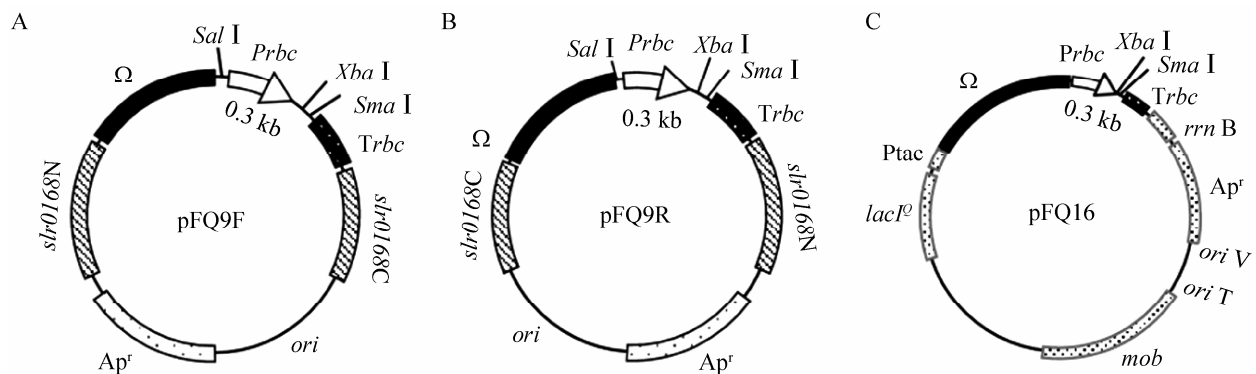


图 2 本研究构建的表达质粒图谱

Fig. 2 Maps of the constructed gene expression plasmids. (A) pFQ9F: The direction of the expression cassette is forward to *slr0168*. The target gene fragment (without ATG) can be inserted to the *Xba* I -*Sma* I site between the promoter and the terminator. The *Sal* I -*Xba* I site can be used for promoter replacement. *slr0168N*: the N terminal of *slr0168*; *slr0168C*: the C terminal of *slr0168*; *Ap^r*: ampicillin resistance gene; Ω : Expression cassette for spectinomycin resistance gene; *ori*: replicon. (B) pFQ9R: the direction of the expression cassette is reverse to that of pFQ9F. (C) pFQ16: the shuttle vector that was designed for conjugative transfer of the expression cassette into other cyanobacteria strains.

引物克隆目的基因片段 (不含起始密码子), 将其插入到启动子和终止序列之间。同时选取 *rbcS* 终止密码子下游 200 bp 的片段作为外源基因表达元件的终止序列 *Trbc*, 并在两端设计了酶切位点 (图 1)。

2.2 集胞藻 PCC6803 外源基因表达平台表达 β -半乳糖苷酶酶活测定及表达效率对比

本文选择了以 pFQ20 质粒作为代表, 用 *lacZ* 报告基因比较了与 pHB1567 的驱动活性差异。 *lacZ* 作为一种报告基因, 具有不影响生物细胞的生长的优点, 已经在蓝细菌得到运用^[39]。与其他报告蛋白, 如荧光素酶^[40]和荧光蛋白^[41]相比, β -半乳糖苷酶以 ONPG 为底物进行显色反应, 因此可以避免来自蓝细菌细胞内的还原醛以及光合色素等带来的背景干扰, 其测定具有显色灵敏和区分度大的优势。因此, 本文选用 *lacZ* 作为报告基因并检测所构建平台 pFQ20 的表达效率

(图 3)。实验以含整合有壮观抗性基因的突变株 Syn-LY2^[42]作为阴性对照, 以整合有 *PpetE* 启动子和 *lacZ* 报告基因的突变株 Syn-HB1567^[22]作为阳性对照。在 Syn-HB1567 中, 铜离子诱导型启动子 *PpetE* 在 BG11 培养液 (铜离子浓度为 316 nmol/L) 驱动表达的 β -半乳糖苷酶活性为 71.5 Miller, 与已报道结果相近。与之相比, Syn-FQ20 菌种中的 β -半乳糖苷酶活性为 109 Miller, 与对照启动子 *PpetE*^[22]相比, *PrbcL* 启动子表达效率高出 52.5%。细胞的生长状态对 Miller 值有一定的影响, 因此本实验中采用对数生长期的细胞 (OD_{730} 在 1.2~1.5 之间) 进行酶活性测定, 因此 Miller 值比生长中后期 ($OD_{730} > 1.5$) 细胞所测得的更高。

2.3 集胞藻 PCC6803 表达大肠杆菌硫酯酶

为了检验该表达构建对外源蛋白的表达情况, 本文以 pFQ20 为出发质粒, 克隆表达了来自

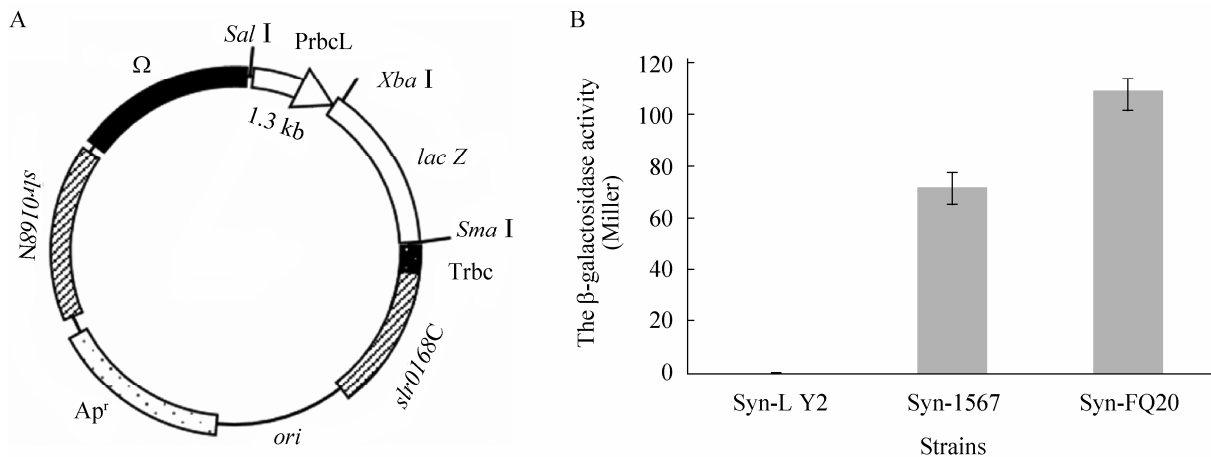


图3 pFQ20质粒结构示意图(A)及集胞藻PCC6803突变株中的 β -半乳糖苷酶活性(B)

Fig. 3 Structure of pFQ20 (A) and the β -galactosidase activity in Syn-FQ20 (B). (A) the *lacZ* gene was inserted into the pFQ20 using *PrbcL* as the promoter. (B) Syn-LY2 was used as a negative control, harboring the Ω fragment in *slr0168* locus; Syn-HB1567 was used as the positive control applying the copper-induced promoter of *PpetE* and the *lacZ* reporter gene. Syn-FQ20 was the mutant strain that transformed by pFQ20.

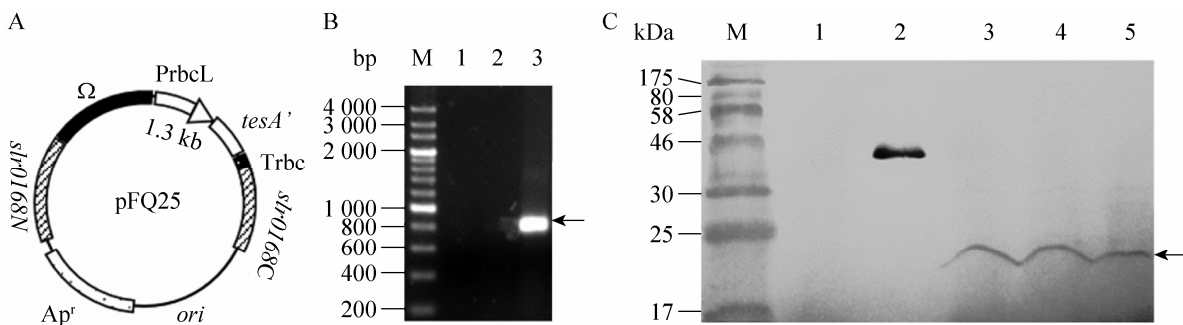


图4 pFQ25构建(A)、PCR检测Syn-FQ25突变株的基因型(B)以及Western blotting(C)检测大肠杆菌硫酸酯酶A在集胞藻PCC6803突变株中的表达

Fig. 4 Map of pFQ25 (A) and PCR analysis of the genotype of Syn-FQ25 (B) and Western blotting (C) analysis of *E. coli* TesA' expression in Syn-FQ25. (B) M: DNA marker (200 bp DNA Ladder); 1: blank control (PCR without DNA template); 2: negative control (genomic DNA of wild type *Synechocystis* was used as template for PCR); 3: PCR product using the genomic DNA of Syn-FQ25 as a template, the same primers of *slr0168-3* and *tesA-1* were used in 1-3; (C) M: protein marker; 2: the negative control of Syn-LY2; 3: positive control using a purified his-tagged enzyme; 4-6: triplicate samples of strain Syn-FQ25.

大肠杆菌硫酸酯酶基因 *tesA*^[35-36], 并在蛋白的羧基端加入了一个 6×His-tag 标签以追踪本表达平台对外源蛋白的表达情况。

表达质粒 pFQ25 (图 4) 转化集胞藻

PCC6803, 得到突变株 Syn-FQ25。突变株经粗提蛋白质后经过 SDS-PAGE (浓度为 12%) 和 Western blotting 检测, 结果显示在 20 kDa 处有显著条带 (图 4)。*tesA*'-histag 长度为 576 bp, 其

编码蛋白携带 6 个组氨酸标签 (6×His-tag) 并在 N 端加入了两个氨基酸 (*Xba* I 位点编码), 总计 191 个氨基酸, 预测分子量为 21.7 kDa, 所以, 最终纯化得到的蛋白与预测的蛋白大小基本相符, 说明该表达平台对外源蛋白具有很高的表达效率, 可用于在集胞藻 PCC6803 中表达外源蛋白。

3 讨论

本文基于不同长度的 *rbc* 启动子构建了 4 个可以用于集胞藻 PCC6803 基因表达平台质粒, 其中 pFQ20 表达质粒采用 *lacZ* 报告基因比较了与 pHB1567 的驱动活性差异, 同时利用该质粒表达了外源的 *tesA'*。结果显示, pFQ20 对报告基因的表达效率是 109 Miller, 同时 Western blotting 检测到了 *TesA'* 明显的条带。文献报道 *rbcL* 启动子是上游 250 bp 区域^[30], 本文构建的 *rbc* 启动子 (0.3 kb 和 1.3 kb) 包含了基因表达必需的元件, 可以在蓝细菌中高效稳定表达外源基因的并合成目的产物。例如, Tan 等^[42]在 *Metabolic Engineering* 杂志上发表的蓝细菌合成脂肪醇及脂肪烃的研究采用的就是本文构建的表达平台。其中, pFQ9R 被用来表达脂酰还原酶基因 *far_jojoba*, 脂肪醇产量为 $(9.7 \pm 2.7) \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{730})$, pFQ20 被用于串联表达乙酰辅酶 A 羧化酶基因 *accBCDA* 基因, 其脂肪烃产量提高到 $(161.6 \pm 10.3) \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{730})$ 。以 *PpetE* 为启动子驱动相同基因合成脂肪醇产量为 $(5.3 \pm 1.2) \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{730})$, 脂肪烃产量提高到 $(114.9 \pm 13.7) \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{730})$ ^[42]。基于本表达平台的突变株中脂肪醇和脂肪烃的产量更高。例如, Gao 等^[11]利用基于 pFQ20 表达平台表达了丙酮酸脱羧酶 PDC 以及乙醇脱氢酶

ADH 在集胞藻 PCC6803 中高效合成乙醇。例如, Gao 等利用 pFQ20 平台成功表达脂酰 CoA 合成酶 *Slr1609*^[15,43]进行酶学研究并成功测定了其脂肪族产物的影响。同样, 广宿主穿梭质粒 pFQ16 具有相同的表达元件, 又因蓝细菌株之间利用共用保守的核糖体, 因此可以被应用到其他的蓝细菌菌株。本文没有在其他蓝细菌菌株中做进一步效率测定。但已经有报道证明蓝细菌可以利用细菌来源的 *P_{trc}* 及 *P_{tac}* 启动子^[35], 因此集胞藻 PCC6803 来源的启动子在其他蓝细菌中应更有优势。

4 结论

本文通过采用强启动子及强终止序列以及使用翻译融合策略, 保护启动子的 SD 序列及 SD 与起始密码子之间的间隔序列 (SD-AUG), 构建了高效的蓝细菌基因表达平台。本研究构建的表达平台在基因工程改造集胞藻合成生物燃料领域具有重要的应用价值, 文中所采用的基因表达策略也为在蓝细菌中高效稳定表达外源基因提供了借鉴。

致谢: 感谢中国科学院水生生物研究所徐旭东研究员及高宏副研究员为本研究提供 pHB1567 质粒, 特致谢意!

REFERENCES

- [1] Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(2): 95–103.
- [2] Grigorieva G, Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Lett*, 1982, 13(4): 367–370.
- [3] Nakamura Y, Kaneko T, Hirokawa M, et al.

- CyanoBase, a WWW database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(1): 63–67.
- [4] Deshmukh DV, Puranik PR. Statistical evaluation of nutritional components impacting phycocyanin production in *Synechocystis* sp. *Brazilian J Microbiol*, 2012, 43(1): 348–355.
- [5] Reinsvold RE, Jinkerson RE, Radakovits R, et al. The production of the sesquiterpene beta-caryophyllene in a transgenic strain of the cyanobacterium *Synechocystis*. *J Plant Physiol*, 2011, 168(8): 848–852.
- [6] Wu GF, Shen ZY, Wu QY. Modification of carbon partitioning to enhance PHB production in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 30(6): 710–715.
- [7] Angermayr SA, Paszota M, Hellingwerf KJ. Engineering a cyanobacterial cell factory for the production of lactic acid. *Appl Environ Microb*, 2012, 78(9): 7098–7106.
- [8] Ozturk S, Aslim B, Suludere Z. Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresour Technol*, 2009, 100(23): 5588–5593.
- [9] Zhou J, Zhang HF, Zhang YP, et al. Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium *Synechocystis* enables production of acetone from carbon dioxide. *Metab Eng*, 2012, 14(4): 394–400.
- [10] Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng*, 2010, 12(1): 70–79.
- [11] Gao ZX, Zhao H, Li ZM, et al. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energ Environ Sci*, 2012, 5(12): 9857–9865.
- [12] Dexter J, Fu PC. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. *Energ Environ Sci*, 2009, 2(8): 857–864.
- [13] Varman AM, Xiao Y, Pakrasi HB, et al. Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 for isobutanol production. *Appl Environ Microb*, 2013, 79(3): 908–914.
- [14] Liu, XY, Sheng J, Curtiss III R. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 6899–6904.
- [15] Gao QQ, Wang WH, Zhao H, et al. Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5(1): 17.
- [16] Hu P, Borglin S, Kamennaya NA, et al. Metabolic phenotyping of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 engineered for production of alkanes and free fatty acids. *Appl Energy*, 2013, 102: 850–859.
- [17] Williams JGK. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Method Enzymol*, 1988, 167: 766–778.
- [18] Kreps S, Ferino F, Mosrin C, et al. Conjugative transfer and autonomous replication of a pomiscuous IncQ plasmid in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol Gen Genet*, 1990, 221(1): 129–133.
- [19] Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, et al. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene*, 1986, 48(1): 119–131.
- [20] Bustos SA, Golden SS. Expression of the *psbDII* gene in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 requires sequences downstream of the transcription start site. *J Bacteriol*, 1991, 173(23): 7525–7533.
- [21] Mackey SR, Choi JS, Kitayama Y, et al. Proteins found in a CikA interaction assay link the circadian clock, metabolism, and cell division in *Synechococcus elongatus*. *J Bacteriol*, 2008, 190(10): 3738–3746.
- [22] Gao H, Tang Q, Xu XD. Construction of copper-induced gene expression platform in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Acta Hydrobiol Sin*, 2007, 31(2): 240–244 (in Chinese).
高宏, 唐蜻, 徐旭东. 集胞藻 PCC6803 铜离子诱导表达平台的构建. *水生生物学报*, 2007, 31(2):

- 240–244.
- [23] Briggs LM, Pecoraro VL, McIntosh L, et al. Copper-induced expression, cloning, and regulatory studies of the plastocyanin gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol*, 1990, 15(4): 633–642.
- [24] Liu XY, Curtiss III R. Nickel-inducible lysis system in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21550–21554.
- [25] Huang HH, Camsund D, Lindblad P, et al. Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2577–2593.
- [26] Takeshima Y, Takatsugu N, Sugiura M, et al. High-level expression of human superoxide dismutase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(21): 9685–9689.
- [27] Takeshima Y, Sugiura M, Hagiwara H, et al. A novel expression vector for the cyanobacterium, *Synechococcus* PCC 6301. *DNA Res*, 1994, 1(4): 181–189.
- [28] Wang Y, Xu XD. Regulation by *hetC* of genes required for heterocyst differentiation and cell division in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol*, 2005, 187(24): 8489–8493.
- [29] Deng MD, Coleman JR. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(2): 523–528.
- [30] Amichay D, Levitz R, Gurevitz M. Construction of a *Synechocystis* PCC6803 mutant suitable for the study of variant hexadecameric ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase enzymes. *Plant Mol Biol*, 1993, 23(3): 465–476.
- [31] Gold L, Pribnow D, Schneider T, et al. Translational initiation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol*, 1981, 35(1): 365–403.
- [32] Matteucci M, Heyneker H. Targeted random mutagenesis: the use of ambiguously synthesized oligonucleotides to mutagenize sequences immediately 5' of an ATG initiation codon. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11(10): 3113–3121.
- [33] Black TA, Wolk CP. Analysis of a Het-mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *J Bacteriol*, 1994, 176(8): 2282–2292.
- [34] Scholz P, Haring V, Wittmann-Liebold B, et al. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*, 1989, 75(2): 271–288.
- [35] Davis MS, Solbiati J, Cronan Jr JE. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28593–28598.
- [36] Cho H, Cronan Jr JE. Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis. *J Biol Chem*, 1995, 270(9): 4216–9.
- [37] Zang X, Liu B, Liu SM, et al. Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Microbiol*, 2007, 45(3): 241.
- [38] Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. Miller JH, Editor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- [39] Schaefer MR, Golden SS. Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *J Bacteriol*, 1989, 171(7): 3973–3981.
- [40] Kondo T, Strayer CA, Kulkarni RD, et al. Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(12): 5672–5676.
- [41] Argueta C, Yuksek K, Summers M. Construction and use of GFP reporter vectors for analysis of cell-type-specific gene expression in *Nostoc punctiforme*. *J Microbiol Methods*, 2004, 59(2): 181–188.
- [42] Tan XM, Yao L, Gao QQ, et al. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 169–176.
- [43] Gao QQ, Tan XM, Lu XF, Enzymatic and physiological characterization of fatty acid activation in *Synechocystis* sp. PCC6803. *J Basic Microbiol*, 2013, doi: 10.1002/jobm.201200228.

(本文责编 郝丽芳)