来源于 *Pyrococcus furiosus* 的耐高温 α-淀粉酶基因在衣藻叶绿体中的表达

Expression of the Gene Coding for a Thermostable α-amylase from *Pyrococcus furious* in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplast

杨宗岐[1,2]，李轶女[2]，张志芳[2]，王 勇[1]，沈桂芳[2]*

YANG Zong-Qi[1,2], LI Yi-Nü[2], ZHANG Zhi-Fang[2], WANG Yong[1] and SHEN Gui-Fang[2]*

1 南开大学生命科学学院，天津 300071

2 中国农业科学院生物技术研究所，北京 100081

1 *College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin* 300071, *China*

2 *Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100081, *China*

摘 要 来源于 *Pyrococcus furiosus* 的耐高温 α-淀粉酶是一种重要的酒精工业用酶，在植物中表达耐高温 α-淀粉酶可以大大降低用植物秸秆生产酒精的成本。选择衣藻叶绿体基因组同源片段 *clpP-trnL-petB-chlL-rpl*23-*rpl*2 和壮观霉素抗性基因，构建了来源于 *Pyrococcus furiosus* 的耐高温 α-淀粉酶基因的衣藻叶绿体表达载体 p64A。通过基因枪将其导入衣藻叶绿体中，经壮观霉素抗性(100mg/L)筛选，获得了 9 个抗性衣藻转化子。转化子经过抗性继代筛选后，经 PCR、Southern blot 检测分析及暗培养，证实耐高温 α-淀粉酶基因已整合到衣藻叶绿体基因组中并得到表达。酶活性检测表明，转基因衣藻表达产物具有耐高温 α-淀粉酶活性，每克鲜重衣藻最高达 77.5u。实验结果证明在植物叶绿体中表达工业酶制剂是可行的。

关键词 *Pyrococcus furiosus*，耐高温 α-淀粉酶，叶绿体表达，衣藻

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)04-0545-05

Abstract Thermostable α-amylase from *Pyrococcus furious* is an important industrial enzyme in brewing and alcohol production. Eexpression of the thermostable α-amylase in plants can reduce greatly costs in the production of alcohol using crop plants. A chloroplast expression vector, p64A, containing the thermostable α-amylase gene from *Pyrococcus furious*, was constructed with *clpP-trnL-petB-chlL-rpl*23-*rpl*2 as *Chlamydomonas reinhardtii* plastid homologous recombinant fragments and spctinomycin-resistant *aadA* gene as select marker. The plasmid p64A was transferred into the chloroplast genome of *C. reinhardtii* by the biolistic method. Nine independently transformed lines were obtained by 100mg/L spectinomycin selection. PCR amplification, Southern blot analysis of the transgene and cultivation in the dark all showed that the α-amylase gene had been integrated into chloroplast genome of *C. reinhardtii*. The activity of amylase expressed in the chloroplast of *C. reinhardtii* was detected by amylase activity assay and found to be as high as 77.5u/g fresh weight of cells. These experimental results demonstrated the possibility of using transgenic chloroplasts of plant as bioreactors for production of industrial enzymes.

Key words *Pyrococcus furiosus*, thermostable α-amylase, chloroplast expression, *Chlamydomonas reinhardtii*

Received: January 16, 2006; Accepted: March 6, 2006.

This work was supported by grant from 948 Item Agricultural Department of China (No.2003Z88).

* Corresponding author. Tel: 86-10-68919854; E-mail: yangzongqi@mail.nankai.edu.cn.

农业部 948 项目资助 (No.2003Z88)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

耐高温 α-淀粉酶是目前工业上用量最多的酶之一,广泛应用于食品、制药、酿造、发酵及纺织工业中的淀粉加工。来源于嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 的胞外 α-淀粉酶以其优异的耐热性能而受到关注。该酶具有很高的热稳定性,活性不依赖于钙离子,最适的反应活性在高温下实现,且半寿期长。此外,高温下酶促反应可减少杂菌的污染机会;反应不需用冷却水,可节约能源;淀粉粘稠度的降低能减少输送时的动力消耗[1]。近十几年来,随着利用植物非食品部分如玉米、水稻和小麦的秸秆,甘蔗废料等发酵生产能源燃料乙醇技术的发展和应用,耐高温 α-淀粉酶的市场需求越来越大。但是,由于在乙醇生产过程中需要加入大量的酶制剂,所以生产成本较高。用植物秸秆等废弃物生产乙醇虽然使生产成本大大降低,但耐高温酶的用量大增[2]。因此,利用植物转基因技术将耐高温 α-淀粉酶基因导入植物中,使其在植物中表达,可避免在秸秆发酵过程中加入外源耐高温 α-淀粉酶,达到进一步降低生产成本的目的。

叶绿体遗传转化是近 20 年发展起来的一种新的植物基因工程技术,与传统的核转化相比其具有超量表达目的基因;以定点整合方式导入外源基因从而消除了位置效应及基因沉默;具原核表达方式,能以多顺反子的形式表达多个基因;母系遗传方式可防止基因扩散以及基因产物区域化等优点,已成为目前植物生物反应器研究热点之一[3]。

本研究将来源于嗜热火球菌 *Pyrococcus furious* 的耐高温 α-淀粉酶 *amy* 基因成功地导入叶绿体转化模式植物衣藻叶绿体中使其表达,表达产物具有耐高温 α-淀粉酶活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料:野生型衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* 137CC)来自 Dr. E. H. Harris, Duke University, Durham NC27706,培养方法参见文献[4]。

1.1.2 菌株和质粒:大肠杆菌(*E. coli*)菌株 DH5α 为本室保存,质粒 pAK 中克隆有嗜热火球菌 *Pyrococcus furious* 的高温 α-淀粉酶 *amy* 基因(由中国农科院生物技术研究所张志芳研究员惠赠)。质粒 patpX 和 p64D 由本实验室构建并保存,patpX 上克隆有衣藻叶绿体 *atpA* 基因 5′端启动子、*rbcL* 基因 3′端终止子和一组多克隆位点,p64D 上克隆有衣藻叶绿体特异表达的 *aadA* 表达盒及同源片段 *clpP-trnL-petB-chlL-rpl23-rpl2*,其中缺失 *chlL* 结构基因约 1.0kb,并在 *chlL5′* 和 *chlL3′* 之间引入多克隆位点 *Eco*R Ⅴ、*Bam*H Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Avr* Ⅱ、*Bsm* Ⅰ。

1.1.3 工具酶及分子生物学试剂:各种限制酶、*Pfu* DNA 聚合酶、Klenow 酶、T4 DNA 连接酶、Mung bean 核酸酶和 dNTPs 等购自 Promega 公司,DNA 回收试剂盒 NucleoTrap 为 ClonTech 公司产品,PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,DNA 序列测定由上海基康生物技术有限公司完成,引物标记试剂盒购自美国 Promega 公司,同位素(α^{32}-P-dATP)购自北京亚辉生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取、DNA 片段克隆、重组质粒鉴定:参照 Sambrook 等[5] 分子克隆方法。

1.2.2 基因枪转化:采用美国 BIO-RAD 公司 Model PDS-1000/He Biolistic particle delivery system 转化衣藻。参数为:真空度 28inches 汞柱、轰击距离 9cm、氦气压力 1100psi、金粉颗粒直径 1.0μm。

1.2.3 衣藻 DNA 的提取,参阅文献[6]。

1.2.4 衣藻蛋白质提取,参阅文献[7,8]。

1.2.5 引物:根据 *amy* 基因序列设计一对特异引物:P1:5′-TAGCAAGTCCAGTAAGTGCAGC-3′,P2:5′-ATACGGAGTACCCATAGTAGCC-3′。为研究衣藻叶绿体转化子的同质化程度而设计的 chlL5′下游、chlL3′上游引物:P3:5′- GGTTTGCCGAACAATGTTTTTATTCCTG-3′,P4:5′-AGAGGAAAGTATTTAAAGCTGCTTATTC-3′。

1.2.6 α-淀粉酶活性测定:采用 Somogyi-Nelson 方法[9]。α-淀粉酶活性单位(u)定义为:在 95℃、pH4.5 的条件下,每分钟 α-淀粉酶分解可溶性淀粉产生 1μmol 还原糖(以麦芽糖含量计)所需的酶量为一个活性单位。活性测定缓冲液为 20mmol/L 乙酸钠,5mmol/L $CaCl_2$ 和 1mmol/L $MgSO_4$,用冰乙酸调至 pH4.5。底物是用测定缓冲液溶解的浓度为 1%(*W*/*V*)可溶性淀粉溶液,反应时间 10min,反应体系 2mL,含 1mL 底物和 1mL 稀释的酶液。

1.2.7 转基因衣藻的表型分析:将转基因衣藻和野生型衣藻分别涂于 TAP 固体培养基平板上,用锡箔纸包好,置于 25℃ 培养箱内,10d 后观察表型变化。

2 结果与分析

2.1 衣藻叶绿体表达载体的构建

将质粒 patpX 用 *Nco* Ⅰ 酶切,用 Mung bean 核酸酶削平该位点以去除起始密码子 ATG,连接后得到

© 中国科学院微生物研究所期刊编辑部 http://journals.im.ac.cn

质粒 patpY;将质粒 pAK 用 *Bgl* Ⅱ和 *EcoR* Ⅰ双酶切,用 Klenow 大片段酶补平 *EcoR* Ⅰ位点,电泳回收 1.4kb 的耐高温 α-淀粉酶基因片段,将其克隆于质粒 patpY 的 *Bam*HⅠ和 *Xba* Ⅰ(补平)位点之间,得到中间载体 pYA,使耐高温 α-淀粉酶基因置于衣藻叶绿体基因特异启动子 5′ *atpA* 和终止子 3′ *rbcL* 调控之下;再用 *Eco*RⅠ和 *Not* Ⅰ双酶切 pYA,并补平 *Not* Ⅰ位点,回收含有 *amy* 基因的 DNA 片段,将其克隆入质粒 p64D 的 *EcoR*Ⅴ位点,构建成耐高温 α- 淀粉酶基因衣藻叶绿体表达载体 p64A(图 1)。

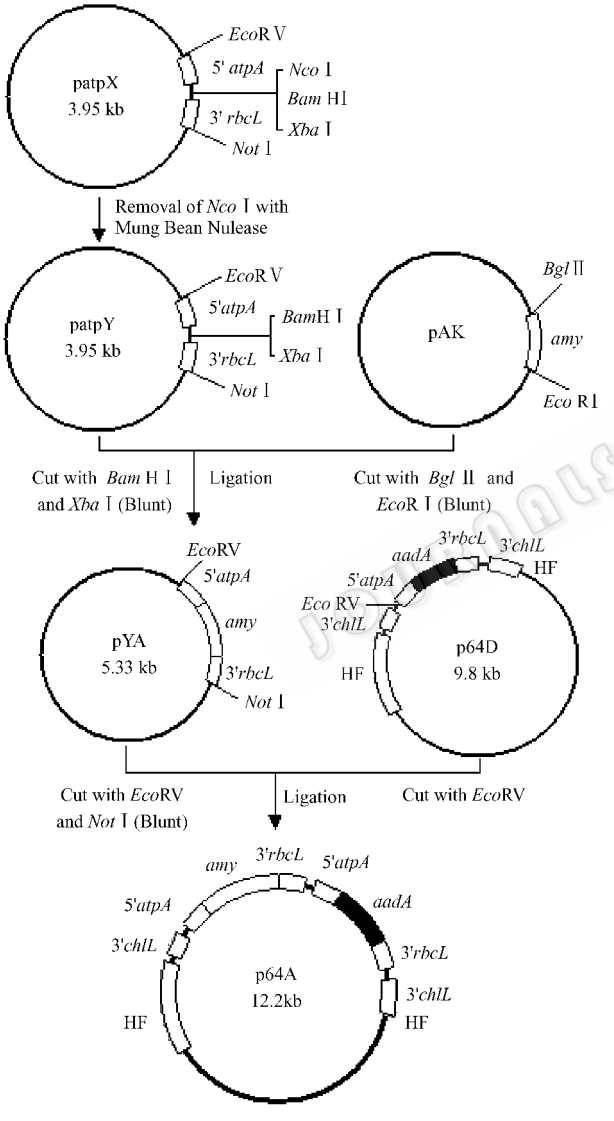

图 1 衣藻叶绿体转化质粒 p64A 构建示意图

Fig.1 Construction of *C. reinhardtii* chloroplast transformation plasmid p64A. HF: homologous fragment

2.2 衣藻叶绿体的转化及转基因衣藻的获得

用包裹有质粒 p64A 的金粉子弹轰击野生型衣藻受体细胞,过渡培养后涂布于抗性筛选 TAP 培养基上(含壮观霉素 Spc 100μg/mL),25℃,3000lx 的连续光照条件下培养。7 ~ 10d 后平板上出现绿色的单藻落,而空载金粉轰击的野生型衣藻细胞在抗性筛选 TAP 培养基(含壮观霉素 Spc 100μg/mL)上则完全白化死亡。这些绿色抗性单藻落能在二次继代筛选的抗性选择培养基中正常生长,这初步表明高温 α-淀粉酶基因和 *aadA* 基因可能通过同源重组整合到衣藻叶绿体基因组中。本实验共轰击 8 枪,得到 9 个抗性衣藻单藻落。

2.3 转基因衣藻的 PCR 检测

抗性衣藻经过 6 轮抗性继代筛选后,提取衣藻 DNA。用耐高温 α-淀粉酶基因的一对特异引物 P1 和 P2 进行 PCR 检测,同时以质粒 p64A 为阳性对照。扩增结果(图 2)显示以抗性衣藻 DNA 为模板能扩增出 1.4kb 的片段,而以野生型衣藻 DNA 为模板,则没有扩增出相应的片段。

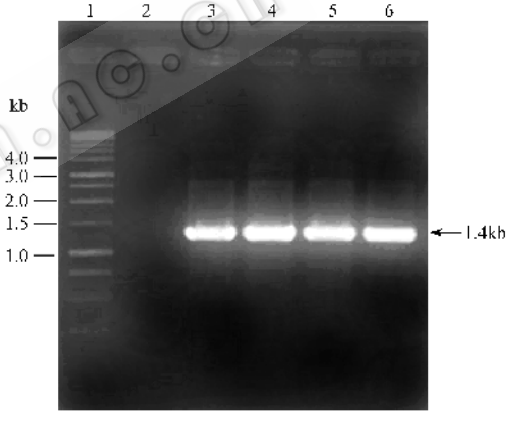

图 2 衣藻叶绿体转化子 *amy* 基因的 PCR 分析

Fig.2 PCR analysis of *C. reinhardtii* transformants of *amy* gene 1: 1.0kb DNA markers (Promega); 2: the wild type; 3: p64A as the positive control; 4 ~ 6: *C. reinhardtii* transformant lines.

2.4 转基因衣藻同质化程度的 PCR 扩增分析

尽管衣藻细胞内只有一个叶绿体,但是这个叶绿体却含有 80 ~ 100 个叶绿体基因组拷贝,因此同时转化这么多基因组是不可能的。在叶绿体转化的初期,只有少数叶绿体基因组拷贝整合了外源基因,所以最初的叶绿体转化细胞是一种异质体(heteroplasmic),含有野生型和转化型两种叶绿体基因组拷贝,需要进一步提高外源基因在衣藻叶绿体基因组中的同质化程度。

为了检验外源基因是否定点整合入衣藻叶绿体基因组 *chlL* 基因之间及外源基因在衣藻叶绿体基因组中的同质化程度,以衣藻转化子和野生型衣藻 DNA 为模板,P3 和 P4 为引物,进行 PCR 扩增分析,

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

结果如图 3 所示。当以野生型衣藻 DNA 为模板,用上述同源片段引物进行 PCR 扩增时,应扩增出一条 1.0kb 的条带(图 3A)。完全同质化的衣藻转化子(转基因叶绿体基因组拷贝完全取代野生型叶绿体基因组),应只扩增出一条 4.6kb 的 DNA 条带(图 3B)。扩增结果如图 3 C 显示,经过六轮次壮观霉素筛选后,衣藻叶绿体转化子的 PCR 扩增产物中没有 1.0kb 的条带,4.6kb 的条带非常清晰,而野生型衣藻则仅扩增出 1.0kb 的条带,说明此时的衣藻叶绿体转化子中,转基因叶绿体基因组拷贝已完全取代了野生型叶绿体,衣藻叶绿体转化子同质化程度已经很高。

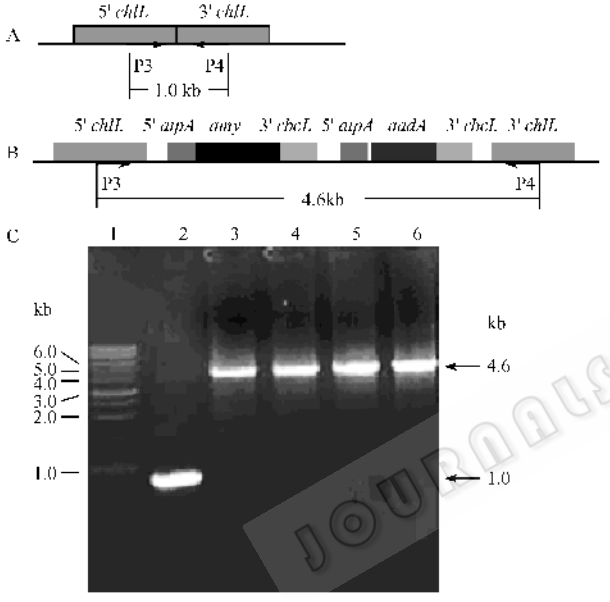

图 3 衣藻叶绿体转化子的同质化程度 PCR 分析

Fig.3 PCR analysis of the degree of homogeneity of *C. reinhardtii* transformants

A: Schematic diagram of amplification using DNA of the *wild type C. reinhardtii* chloroplast; B: Schematic diagram of chloroplast transformants; C: Separation of PCR products by agarose gel electrophoresis. 1: 1.0kb DNA markers (Promega); 2: the wild type; Lane 3: p64A as the positive control; 4~6: *C. reinhardtii* transformant lines.

2.5 转基因衣藻的 Southern blot 检测

为了进一步确定外源基因在衣藻叶绿体基因组中的整合情况,本实验以 1.4kb 的耐高温 α-淀粉酶基因为探针,与上述鉴定转化子和野生型衣藻同质化程度的 PCR 产物进行杂交,同时以质粒 p64A 为阳性对照。Southern blot 分析结果表明,衣藻转化子均能杂交出一条 4.6kb 的条带,与阳性对照的杂交条带大小一致,而野生型衣藻没有出现杂交条带,如图 4 所示,证明了 PCR 扩增出的 4.6kb 条带含有外源目的基因片段,同时也证明了外源耐高温 α-淀粉酶基因确实整合到叶绿体基因组中。

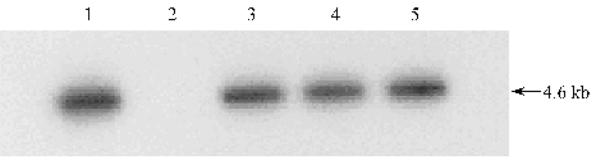

图 4 以 1.4kb 的 *amy* 基因为探针的 PCR-Southern 分析

Fig.4 Southern blotting analysis of the PCR products probed with *amy* gene.

1: Positive control; 2: the wild type; 3~5: *C. reinhardtii* transformant lines.

2.6 转基因衣藻 α-淀粉酶活性的测定

采用 Somogyi-Nelson[8] 方法,用经过 6 轮抗性筛选的衣藻转化子的总蛋白提取液测定 α-淀粉酶活性,结果(图 5)表明,测定的 3 株衣藻转化子均表现出较高的 α-淀粉酶活性,其中最高的酶活力为 77.5u/g 鲜重衣藻。

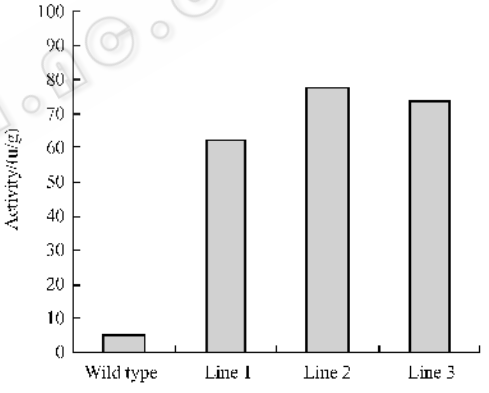

图 5 衣藻转基因植株 α-淀粉酶活性分析

Fig.5 Analysis of recombinant α-amylase activities of *C. reinhardtii* transformant lines

2.7 转基因衣藻的表型分析

野生型衣藻与其它一些植物不同,能在黑暗中合成光非依赖性叶绿素(light-independent chlorophyll)而呈现绿色,这是因为野生型衣藻能产生光非依赖性的原叶绿素酸酯还原酶(light-independent protochlorophyllide reductase),它由 *chlL*、*chlN*、*chlB* 三种基因编码,其中任一基因的缺失,将导致衣藻在黑暗中生长时呈现黄绿色。将野生型衣藻和转化子在平皿上划线暗培养,10d 后,显示出转基因衣藻为黄绿色,而野生型衣藻为绿色(图 6),说明转基因衣藻的叶绿体 DNA 中大部分 *chlL* 结构基因已被外源基因表达盒所取代。同时,也证明通过同源重组置换某些功能基因及表型分析是研究植物叶绿体分子结构和功能的有效途径。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

图 6 暗培养转基因衣藻表型分析

Fig.6 Phenotype of transformants(A) and wild type(B) under dark growth conditions

3 讨论

目前国内外耐高温淀粉酶均用微生物工程表达系统生产。植物叶绿体表达系统是近十几年来发展起来的一种新的高效表达系统,其具有表达量高、表达具有原核性、定点整合、生物安全性高及生产成本低等优点使其成为植物基因工程领域的研究热点。到目前为止,国内外尚未见到用植物叶绿体表达高温淀粉酶和其他工程酶的报道。

本研究将来源于嗜热火球菌 *Pyrococcus furious* 的 α-淀粉酶基因导入叶绿体转化模式植物——衣藻叶绿体中并获得表达,为在叶绿体中表达工程酶进行了一些有意义的探索。虽然在筛选到的衣藻转化子中,淀粉酶的活性可达 77.5u/g 鲜重衣藻,但表达量与微生物表达系统相比还是比较低的。因此,对于这种性质特殊的极端酶,如何进一步提高其在叶绿体表达系统中的表达量,还有待于进一步的研究。叶绿体起源于原核生物蓝细菌,遗传表达具有原核性[10],其基因组基因的排列方式、调控方式、GC 碱基对含量及翻译所偏爱的密码子与原核生物相接近,可以直接表达来自原核生物的基因,无需进行繁琐的密码子优化改造。但高温 α-淀粉酶基因来源于极端高温菌 *Pyrococcus furious*,其基因组的组成及翻译密码子的偏爱性与普通原核生物不同,AT 含量为 57%[11],而衣藻叶绿体基因组的 AT 含量高达 66.3%,其密码子第三位核苷酸 80% 为 A 或 T[12],这可能是导致其在叶绿体中表达量低的原因之一;选择转录和翻译活性强的启动子和终止调节序列也是影响外源基因在衣藻叶绿体中表达量高低的关键因素[13]。本研究用衣藻叶绿体基因的特异启动子 5′ *atpA* 和终止调节序列 3′ *rbcL* 调控耐高温 α-淀粉酶基因的表达,保证了外源基因的表达,但为了进一步提高外源基因的表达量,很有必要继续克隆和改造能在叶绿体中执行功能的强启动子和合适的终止子。叶绿体遗传转化不同于核转化,是通过一对与叶绿体基因组同源的 DNA 序列将外源基因定点整合到叶绿体基因组中,不存在核转化的位置效应,但整合位点在叶绿体基因组中的选择也影响外源基因的表达,即不同插入位点对转化频率和表达效率也有影响,当然这是以整合位点的选择和外源基因的插入不破坏叶绿体本身基因结构为前提的。因此通过对叶绿体转化载体的优化和改造,可以进一步提高外源基因在叶绿体中的表达量。

REFERENCES(参考文献)

[1] Steen Jørgensen, Constantin E Vorgias, Garabed Antranikian. Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular a-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(26): 16335 – 16342

[2] Claire Vieille, Gregory J, Zeikus. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar. 2001, pp. 1 – 43

[3] Daniell H, Khan MS, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*, 2002, **7**(2): 84 – 91

[4] HarrisE. The *Chlamydomonas* sourcebook, a comprehensive guide to biology and laboratory use. *San Diego*: *Academic Press*, 1989.

[5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[6] Rochaix JD, Mayfield S, Goldschmidt-Clermont J, Erickson J. Molecular biology of *Chlamydomonas*, in: C. H. Shaw (Ed.), Plant Molecular Biology. A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1988, pp. 253 – 275

[7] Goldschmits-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycosideadenine transferase in the chloroplast: A selectable marker for site-directed transformation of *chlamydomonas*, *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4083 – 4089

[8] Scott Franklin, Binh Ngo, Ekem Efuet, Stephen P. Mayfield. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*, 2002 **30**(6): 733 – 744

[9] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem*, 1994, **153**(2): 375 – 380

[10] Mcbride KE, Schaaf DJ, Daley M *et al*. Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear encoded and plastid targeted T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Acadmy o Sciences of the United States of America*, 1994, **91**: 7301 – 7305

[11] Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ *et al*. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1993, **136**: 111 – 119

[12] Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T: Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 292

[13] Scott E Franklin, Stephen P Mayfield. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, **7**: 159 – 165

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn