

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 1/13
C12N 15/63 C12N 15/87

[21] 申请号 97108981.7

[43]公开日 1998年3月25日

[11] 公开号 CN 1177002A

[22]申请日 97.7.10

[71]申请人 中山大学

地址 510275广东省广州市新港西路

[72]发明人 李宝健 曹吉祥 徐增富 邱国华

[74]专利代理机构 中山大学专利事务所

代理人 林灿志

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 外源基因转化螺旋藻的方法

[57]摘要

本发明涉及一种将外源基因重组到螺旋藻中，从而获得转基因藻体的方法。本方法以含有外源基因的具有原核表达元件的质粒为转化载体，通过常规转化方法对螺旋藻细胞进行转化处理，再进行继代选择性培养，即可获得转基因螺旋藻。本方法具有简单易操作，效果好的优点，对螺旋藻的品种改良及其开发利用具有重要的意义。

权 利 要 求 书

1、外源基因转化螺旋藻的方法，其特征是以含有外源基因的具有原核表达元件的质粒为载体，以螺旋藻细胞为受体，采用常规的适合于质粒载体的转化方法进行转化处理，再将经转化处理后的螺旋藻细胞进行继代选择性培养，从而获得转基因螺旋藻。

2、按照权利要求1所述的方法，其特征是包括以下步骤：

(1)按常规方法，对用作转化载体的质粒进行扩增，并提取和纯化，制得所需的质粒载体；

(2)将准备作为受体的螺旋藻培养至对数生长期，然后用溶菌酶处理，制得便于接受外源基因的单细胞螺旋藻受体；

(3)采用适合于质粒载体的常规转化方法，用质粒载体对螺旋藻受体进行转化处理；

(4)将经上述转化处理的螺旋藻细胞涂布于含有选择因子的Zarrouk培养基平板上，培养5~10天；然后挑取单一藻落，在加有选择因子的液体Zarrouk培养基中培养至光密度大于0.3；

(5)吸取少量经上述培养后的藻液转入新的加有选择因子的液体Zarrouk培养基中培养5~8天；同法反复接种培养至继代培养不低于20代。

3、按照权利要求2所述的方法，其特征是步骤(2)中用溶菌酶处理的时间为10~20小时，溶菌酶的用量为按W/V比占总液量0.5%~2.0%。

4、按照权利要求2所述的方法，其特征是步骤(3)中所用的转化方法为电激穿孔法、基因枪法或PEG法。

5、按照权利要求4所述的方法，其特征是所说的电激穿孔法是在电压8000~11000伏、脉冲 $2^7 \sim 2^{10}$ 、间隔1~3秒条件下电激10~20次。

6、按照权利要求2所述的方法，其特征是转化时质粒载体与螺旋藻受体的用量比例为5~10微克： $10^6 \sim 10^8$ 细胞数。

外源基因转化螺旋藻的方法

本发明涉及一种利用基因重组技术将外源基因重组到螺旋藻中，从而获得转基因螺旋藻的方法。

螺旋藻是一类适于海、淡水生长且喜高pH、高温的丝状蓝藻。研究表明，螺旋藻含有占干重60~77%的蛋白质以及8种人体所必需的氨基酸，属于完全蛋白质；含有丰富且均衡的维生素B₁、B₂、B₁₂等，还有矿物质元素（如Fe、Mg、Zn等）以及具有多种生理活性的多糖、藻蓝蛋白、类胡萝卜素等。因此，螺旋藻被联合国FAO确定为“人类二十一世纪最理想的食物”。目前，与开展螺旋藻养殖的泰国、墨西哥、以色列等世界各国相比，我国螺旋藻生产规模最大，生产企业有100多家，已逐步形成了新兴产业。但现有养殖的螺旋藻都是天然的品种，与一般的动、植物蛋白源相比，天然螺旋藻的不足之处在于养殖成本过高，因而售价高，竞争力差，只能作为保健食品或其添加成份等有限用途使用。为改变这种状况，一方面要设法延长其生长期（使其全年均能生长），另一方面要拓展其应用与药用价值，以便获得更高附加值的产品。要实现上述目的，采用基因工程技术将能够赋予螺旋藻新的生长或经济上的性状的外源基因导入螺旋藻中并得到整合与表达，是最直接也是最有效的手段。因此，有必要建立螺旋藻稳定的基因转化方法与转化体系，使螺旋藻这一重要的蛋白资源能得到充分的利用。

本发明的目的是提供一种利用外源基因转化螺旋藻的方法，以便建立稳定有效的螺旋藻外源基因转化体系，从而能够直接有效地获得具有优良遗传性状或重要经济价值表达产物的转基因螺旋藻新品种。

本发明的方法是以含有外源基因（目的基因，包括抗性基因）的具有原核表达元件的质粒为转化载体，以螺旋藻细胞为受体，采用常规的适合于质粒载体的转化方法进行转化处理，再将经转化处理后的螺旋藻细胞进行继代选择性培养，从而获得转基因螺旋藻。

本发明方法一般包括以下步骤：

(1)按常规方法，对用作转化载体的质粒进行扩增，并提取和纯化，制得所需的质粒载体；

(2)将准备作为受体的螺旋藻培养至对数生长期，然后用溶菌酶处理，制得便于接受外源基因的单细胞螺旋藻受体；

(3)采用适合于质粒载体的常规转化方法，例如电激穿孔法、基因枪法（微粒轰击法）、PEG法等，用质粒载体对螺旋藻受体进行转化处理；

(4)将经上述转化处理的螺旋藻细胞涂布于含有选择因子的Zarrouk培养基平板上，培养5~10天，然后挑取单一藻落，在加有选择因子的液体Zarrouk培养基中培养至光密度（O·D_{680nm}）大于0.3；

(5)吸取少量经上述培养后的藻液转入新的加有选择因子的液体Zarrouk培养基中培养5~8天；同法反复接种培养至继代培养不低于20代。

经上述方法处理和培养所得的螺旋藻即为目的基因（外源基因）的转化藻体。可供常规培育用。

上述本发明方法中：

步骤(1)所说的转化载体可以是具有原核表达元件并含有特定抗性基因的各种质粒，其物理构型可以为超螺旋形或线形。

步骤(2)中用溶菌酶处理的时间一般为10~20小时，溶菌酶的用量为按W/V比占总液量0.5%~2.0%（终浓度）。

步骤(3)转化时所用的质粒载体及螺旋藻受体的量可依不同转化方法而有所不同，通常为5~10μg质粒/10⁸~10⁹藻细胞数。

步骤(4)中所说的选择因子是与质粒载体所含抗性基因相对应的抗生素或除草剂，通常为氯霉素、PPT等。

步骤(5)中所说的继代培养不低于20代是指通过继代培养，使细胞倍增（分裂）达到20代或以上。

以下实施例将对本发明作进一步说明。

(1)用LB培养基培养含有pBR325质粒（含有氯霉素乙酰转移酶基因，即CAT以及原核表达的启动子和终止子）的DH5α菌种，过夜（10~16小时）；然后用碱法提取pBR325质粒，再用PEG法纯化，得到所需的质粒载体，用TE缓冲液溶解质粒，并使其实际浓度为5微克/毫升；

(2)选用钝顶螺旋藻（*Spirulina platensis*）为受体藻种，在50毫升液体Zarrouk培养基（不含镁离子）中接种藻种后，培养5天（3~8天为指数生长期），离心收获后用1~2ml 10毫摩尔 Tris缓冲液（pH8.0）悬浮，加入占悬浮液

0.5 ~ 2% (W/V) 的溶菌酶粉, 28℃放置10小时, 轻摇, 此时藻丝体大部分变为单细胞状态; 400rpm 离心收获后, 再用上述Tris缓冲液稀释为 10^6 细胞/毫升;

(3)取1毫升质粒载体及10毫升受体细胞, 加入Hepes电激缓冲液至100毫升; 在电压10000伏, 脉冲 2^{μ} , 间隔2秒的条件下电激20次;

(4)将上述经电激转化处理后的螺旋藻细胞移入已加有新鲜液体Zarrouk 培养基的试管中, 培养过夜(10~16小时); 然后在含有氯霉素(25微克/毫升)的Zarrouk固体培养基上涂布, 培养1周; 挑取单藻落, 在含有25~50ppm氯霉素的液体Zarrouk培养基中培养5天, 这时培养藻液光密度(O.D._{660nm})达到0.3~0.6;

(5)吸取少量上述藻液接种至新的含有25~50ppm氯霉素的液体Zarrouk培养基中培养5天; 同样条件下接种培养4次, 螺旋藻细胞倍增达到20代。

本发明利用转化载体(质粒)所含的抗性基因, 通过加有相应选择因子的培养基(选择培养基)对经转化处理的螺旋藻进行选择培养, 已转化的螺旋藻(转化体)因含有抗性基因而可以正常生长, 而非转化体则因没有抗性基因而不能生长(死亡), 因此可直接对转化效果进行鉴定, 并选择出转化体供常规培育用。发明人还通过提取转化藻体DNA, 进行点杂交和Southern杂交, 从分子水平上鉴定转化体。经多次重复上述实施例并进行效果鉴定, 结果表明, 采用本发明的方法转化螺旋藻, 具有较好的稳定性和重复性, 能保证一定的转化率。

本发明方法适用于螺旋藻属的各藻种。

本发明方法能够有效地将外源基因(目的基因)重组到螺旋藻的染色体中, 从而获得转基因螺旋藻新品种。所以通过本发明可以建立稳定的螺旋藻转化体系, 从而实现以基因工程先进技术改良螺旋藻藻种(包括提高藻种产量、质量及各种抗逆性和适应性等)的目的。同时还可以将编码许多在人体中存量甚微但生理功能重要的多肽或蛋白质(如细胞因子)基因(cDNA)插入载体质粒中, 再通过由其转化白螺旋藻专一表达这些本来要由人体提取的物质; 由于转基因螺旋藻具有高效表达蛋白质的能力, 因此表达量可观; 更由于螺旋藻具有光合作用且本身是一各富含多种营养素的食物来源, 因此与现行通用的大肠杆菌及哺乳动物细胞相比, 具有使用(服用)安全、生产条件要求不高及生产成本低等突出优点。