



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102827856 A

(43) 申请公布日 2012.12.19

(21) 申请号 201210326390.2

(22) 申请日 2012.09.06

(71) 申请人 中国科学院水生生物研究所

地址 430072 湖北省武汉市武昌区东湖南路
7号

申请人 中国石油化工股份有限公司

(72) 发明人 孔任秋 徐旭东 刘飞飞 方仙桃

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 黄瑞棠

(51) Int. Cl.

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/13(2006.01)

C12R 1/89(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法,涉及硅藻的遗传育种方法。本方法是:①构建核基因转化质粒;②将转化质粒转入硅藻核基因组中构建随机插入突变体库;③以尼罗红荧光染色比值法对突变体库进行筛选高产油突变株;④细胞中甘油三酯测定和脂肪酸分析;⑤生长测定。本发明可通过随机插入突变选育优良品种,可用于任何成功建立遗传转移系统的硅藻;比基因表达或沉默易于成功筛选出综合性状优良的藻株;与化学诱变、辐射诱变等方法相比没有对人体的危害。所筛选的高产油突变株不仅油脂积累增加了,而且降低了甘油三酯中的多不饱和脂肪酸的比例,使之不需要经过任何饱和修饰即可作为生产生物柴油的原料。

1. 一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法,其特征在于:

本方法包括下列步骤:

①构建核基因转化质粒

该质粒可在 T 载体中克隆一个合适的外源抗性基因,由硅藻本身基因的启动子和终止子或其它真核生物的启动子和终止子,驱动表达和终止;

②将转化质粒转入硅藻核基因组中构建随机插入突变体库

利用基因枪法将所构建质粒对所改造的硅藻进行转化,在抗性平板上进行选择,待转化子达到 5000 个以上的克隆组成一个插入突变体库;突变体库用 PCR 和 DNA 印迹杂交方法检测外源基因的插入率和插入拷贝数,插入率达到 95% 以上,插入拷贝证明是一个或多个拷贝即可开始筛选目标突变体;

③以尼罗红荧光染色比值法对突变体库进行筛选高产油突变株

在 24 孔板中将抗性转化子进行液体培养,转入 96 孔板中批量进行尼罗红染色,测定中性脂荧光,再以同样数量藻样检测叶绿体荧光;根据我们的研究表明,在一定细胞密度范围内,中性脂荧光和叶绿体荧光比值的高低,可以显示不同藻株单位生物量的相对含油量,通过与野生型比较,选出荧光比值显著高于野生型的藻株初步定为高产油株,比值低于野生型的为低产油株;

④细胞中甘油三酯测定和脂肪酸分析

对所选产油突变株以称重法分析总脂和甘油三酯含量;一般将藻株培养至稳衡期,离心收集冷冻干燥后取 100mg 干藻粉,首先以有机溶剂萃取法提取总脂,确定总脂占干重的百分含量后,从总脂中以薄层层析法分离甘油三酯,再确定甘油三酯占干重的百分含量;以气象色谱法分析甘油三酯的脂肪酸组成,所有结果均有野生型对照比较;

⑤生长测定

对所选高产油株在常规光照条件下培养,同时加上野生型对照,每株藻设三个平行,每天或每隔一天测定一次细胞的光密度值,制作生长曲线,比较它们与野生型的生长情况,最后选出具有比野生型甘油三酯含量高,生长又不受到限制和影响的藻株。

2. 按权利要求 1 所述的一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法,其特征在于三角褐指藻:引物 -1、引物 -2、引物 -5 和引物 -6;以及利用该方法筛选硅藻突变株的过程。

一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一类二倍体的产油真核藻类——硅藻的遗传育种方法,尤其涉及一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法;具体地说,本发明是利用遗传操作,将外源基因随机插入到核基因组中,构建突变体文库,筛选一种具有高产油、低不饱和度脂肪酸的突变藻株。

背景技术

[0002] 地球上化石燃料的大规模持续消耗将造成全球性能源短缺,同时化石燃料的使用释放了大量的二氧化碳等有害气体,加速了全球变暖;因此,新能源的开发和利用迫在眉睫,生物柴油作为一种优质的液体燃料替代品应运而生。生物柴油的制备一般采用酯交换法,即用动物脂肪、植物油、微藻和微生物油脂或废弃油中的长链脂肪酸酯(甘油三酯)和甲醇或乙醇等低碳醇,在催化剂(通常采用酸、碱或酶)作用下进行转酯反应,生成相应的脂肪酸甲酯或是乙酯(即生物柴油)。

[0003] 与传统柴油相比,生物柴油具有以下优良特性:

- 1、生物柴油中几乎不含有硫、多环芳香烃、重金属等,使有害物质的排放大幅降低;
- 2、十六烷值是衡量柴油燃烧性能的指标,生物柴油的十六烷值高于传统柴油;
- 3、生物柴油比传统柴油具有更好的润滑性,可以降低对发动机缸、喷油泵和连杆的磨损,因此能够更好地延长机器设备的使用寿命;
- 4、生物柴油高闪点的特性也使得它在运输、贮存和使用过程中更安全。

[0004] 微藻所产的油被认为是制备生物柴油最有应用潜力的原料。微藻生产周期短,能够以工厂化方式培养、收集、提油;但是生产成本需要进一步降低,其油脂也存在脂肪酸不饱和度高引起氧化和酸化的问题。如果可以借助遗传改造的方法进一步提高微藻的产油率,同时降低油脂中的脂肪酸不饱和度,则可以既降低微藻产油成本,又提高由微藻生物柴油的品质。

[0005] 以往对于微藻产油率进行基因改造的思路一般是试图表达产油途径中某个基因提高油脂积累,但至今鲜有成功的报道;利用插入失活或基因沉默的方法阻断淀粉等其他贮藏物的合成,已有提高产油量的报道,但是可导致生长速率显著降低,不利于生产。尤其是硅藻(diatom)这样的二倍体微藻,因其具有两套基因组,一般认为不能够通过基因插入的方法改变其性状,至今还没有报道利用随机插入来筛选其突变体,所以更加难以进行产油率和脂肪酸组成的遗传改造。硅藻通常富含油脂和二十碳五稀酸(二十碳五稀酸英文缩写为EPA,属于多不饱和脂肪酸,是人体自身不能合成但又不可缺少的脂肪酸,在营养和医学上具有重要作用)是用来研制生物柴油以及生产EPA的重要微藻。但是,我们认为由于基因剂量的效应,基因插入失活仍可能导致二倍体硅藻某些性状的变化;而且基因插入也可能激活某些基因的表达,其表型应该不受二倍体的制约。外源基因一般以一个或多个拷贝数随机插入到硅藻基因组DNA中的,因此很有希望选择出所需要的突变体。

[0006] 为此,我们进行了这一技术方法的探索,并获得了成功,形成本项发明技术方案。

发明内容

[0007] 本发明的目的就在于克服现有技术中利用基因沉默或表达产油途径单个基因很难达到微藻产油量提高或者导致生长受到抑制的问题,提供一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法;本方法首次在一种二倍体的微藻利用外源基因随机整合进基因组建立突变体库,并通过筛选获得产油量提高、不饱和脂肪酸比例减少,同时生长又不受影响的藻株。

[0008] 本发明的目的是这样实现的:

以抗性基因转化硅藻构建随机插入突变体库,通过对突变体库的批量筛选,获得具有一定优良性状的突变体,经过传代证明表型稳定。具体地是将具有可带来商业价值的产油硅藻以博来霉素抗性基因等外源基因进行随机插入获得大量的突变子,通过对突变子的筛选获得产油量提高、脂肪酸饱和度降低和生长速率不减的藻株,使之更适合制备生物柴油。通过这种方法也可能筛选出 EPA 比例提高的藻株用来生产 EPA。

[0009] 一、一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法(简称方法)

本方法包括下列步骤:

①构建核基因转化质粒

该质粒可在 T 载体中克隆一个合适的外源抗性基因,例如来源于细菌的博来霉素抗性基因和新霉素磷酸转移酶基因,由硅藻本身基因的启动子和终止子或其它真核生物的启动子和终止子,驱动表达和终止;

②将转化质粒转入硅藻核基因组中构建随机插入突变体库

利用基因枪法将所构建质粒对所改造的硅藻进行转化,在抗性平板上进行选择,待转化子达到 5000 个以上的克隆组成一个插入突变体库;突变体库用 PCR 和 DNA 印迹杂交方法检测外源基因的插入率和插入拷贝数,插入率达到 95% 以上,插入拷贝证明是一个或多个拷贝即可开始筛选目标突变体;

③以尼罗红荧光染色比值法对突变体库进行筛选高产油突变株

在 24 孔板中将抗性转化子进行液体培养,转入 96 孔板中批量进行尼罗红染色,测定中性脂荧光,再以同样数量藻样检测叶绿体荧光;根据我们的研究表明,在一定细胞密度范围内,中性脂荧光和叶绿体荧光比值的高低,可以显示不同藻株单位生物量的相对含油量,通过与野生型比较,选出荧光比值显著高于野生型的藻株初步定为高产油株,比值低于野生型的为低产油株;

④细胞中甘油三酯测定和脂肪酸分析

对所选产油突变株以称重法分析总脂和甘油三酯含量;一般将藻株培养至稳衡期,离心收集冷冻干燥后取 100mg 干藻粉,首先以有机溶剂萃取法提取总脂,确定总脂占干重的百分含量后,从总脂中以薄层层析法分离甘油三酯,再确定甘油三酯占干重的百分含量;以气象色谱法分析甘油三酯的脂肪酸组成,所有结果均有野生型对照比较;

⑤生长测定

对所选高产油株在常规光照条件下培养,同时加上野生型对照,每株藻设三个平行,每天或每隔一天测定一次细胞的光密度值,制作生长曲线,比较它们与野生型的生长情况,最后选出具有比野生型甘油三酯含量高,生长又不受到限制和影响的藻株。

[0010] 二、用途

在替代石油的燃料来源中,微藻处于领导地位,微藻室外大规模培养的多个推广性研

究已得出结论:使用微藻生产低成本生物柴油在技术上是可行的,但是目前由于成本较高导致价格过高,尚需要进一步研发以提高生产力,产油藻的含油量决定了是否能将其产业化生产并具有市场竞争力。在众多微藻中,硅藻因其藻体细胞内有较高的脂肪含量,被认为是最有可能实现产业化生产油脂的藻类之一。按照以上发明,通过对二倍体产油硅藻基因组进行随机插入遗传改良,可以筛选出油含量提高,不饱和脂肪酸降低且生长不减慢的藻株进行生物柴油的制备,这不仅提高了油产量,而且改良了油品质量,节省了后续费用;使得以微藻替代化石原料和油料作物成为可能性进程向前推进;另外由于硅藻许多种类还富含多不饱和脂肪酸(EPA等),利用以上发明,通过脂肪酸含量与比例的分析还可以筛选EPA增加的硅藻藻株用来生产EPA。

[0011] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:

1、本发明在二倍体的硅藻证明可通过随机插入突变选育优良品种,可用于任何成功建立遗传转移系统的硅藻;比基因表达或沉默易于成功筛选出综合性状优良的藻株;与化学诱变、辐射诱变等方法相比没有对人体的危害。

[0012] 2、所筛选的高产油突变株不仅油脂积累增加了,而且降低了甘油三酯中的多不饱和脂肪酸的比例,使之不需要经过任何饱和修饰即可作为生产生物柴油的原料。

附图说明

[0013] 图1是质粒pHB3174结构图;

图2是PCR扩增抗性转化子中 $sh\ ble$ 基因电泳图,图中:

21和42:野生型对照;

1-20和22-41:抗性藻株;

M,100bp DNA markers。

[0014] 图3是突变藻株和野生型三角褐指藻Southern blot杂交分析,图中:

1-4:突变藻株基因组DNA用 $Hind\ III$ 酶切;

6-9:突变藻株基因组DNA用 $EcoR\ I$ 酶切;

5和10:野生型三角褐指藻基因组DNA分别用 $Hind\ III$ 和 $EcoR\ I$ 酶切;

图4是三角褐指藻4株突变株和野生型甘油三酯含量比较;

图5是三角褐指藻突变株和野生型生长曲线。

具体实施方式

[0015] 下面结合附图和实施例详细说明:

一、为了达到以上目的,以三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)为例,本发明采用了以下技术措施:

①构建核基因转化质粒

以其自身基因的启动子和终止子驱动外源抗性基因的表达。以三角褐指藻基因组DNA为模板,以引物-1和引物-2(5'AGGACGCAATGGAGGATTATCACC3'和5'CTCTGCCTAGCCTACACGAC3')PCR扩增出褐藻素叶绿素结合蛋白A基因($fcpA$)全长,克隆到 $Hind\ III$ 位点被T4 DNA聚合酶钝化去除的pUC19中,得到pHB2976。以质粒p105B124为模板,引物-3和引物-4(5'CTAGATATCAAGATGGCCAAGTTGACCA3'和

5' GATAAGCTTCAGTCCTGCTCCTCGG3') 进行 PCR, 扩增出 *sh ble* 基因片段, 替换 *fcpA* 的编码区, 得到 pHB2983。以引物 -5 和引物 -6 (5' AAAGTGAGGAAGGCACAGGA3' 和 5' CTTGATATCCTTGACTTCGAAATATGCGC3') 从三角褐指藻基因组 DNA 中扩增出褐藻素叶绿素结合蛋白 B 基因 (*fcpB*) 启动子序列, 替换 pHB2983 中 *fcpA* 的启动子部分, 得到 pHB3174。

[0016] ②将转化质粒转入三角褐指藻核基因组中构建随机插入突变体库

以基因枪转移法对含有外源基因的质粒 pHB3174 进行核基因转化并进行 zeocin 抗性选择, 构建随机插入突变体文库, 使得突变体库的转化子数量达到 5000 个克隆以上, 并全部接种于 24 孔板进行液体培养。随机挑取转化子进行 PCR, 证明插入阳性率约为 97.5%(图 2,)。通过 Southern blot 杂交证明外源的 *sh ble* 基因确实是通过不同位点随机插入的方式整合进三角褐指藻基因组, 并且插入拷贝数为 1 到多个(图 3,)。

[0017] ③以尼罗红荧光染色比值法对突变体库进行筛选高产油突变株

通过对不同藻液细胞密度与中性脂(甘油三酯)荧光强度及叶绿素 a 荧光强度进行相关性回归分析发现, 同一生长时期的藻细胞, 在一定的密度范围内中性脂荧光强度及叶绿素 a 荧光强度呈线性关系。因而两者的比值可以用于比较各藻株在同一生长时期的单位细胞含油量。

[0018] 将稳定生长期突变体库的各藻株悬液加入 96 孔板中, 每板均设置野生型对照藻液。进行尼罗红染色, 使用 Perkin-Elmer 公司的 LS55 型荧光分光光度计(配置 96 孔板模块, 仪器参数设定为: 激发波长 529nm, 荧光发射波长 578nm, 狭缝宽度均为 5 μ m) 测定中性脂荧光值。另外, 取等量藻细胞液测定叶绿素 a 荧光。用中性脂荧光和叶绿素 a 荧光的比值比较各藻株单位生物量中油脂的含量。经过多轮的筛选, 逐级淘汰, 最后得到 10 株与野生型有显著区别的藻株。

[0019] 将 10 株藻扩大培养至稳衡期, 6000 rpm 离心收集藻细胞, 用灭菌 ddH₂O 洗涤三次; 将收集的藻细胞冷冻干燥处理; 将干藻粉充分研磨, 称取 100 mg 于玻璃离心管中; 加入氯仿甲醇混合溶剂, 每 100 mg 加 4 mL 氯仿: 甲醇(V:V=1:1) 震荡 2 min; 加入 1 mL 灭菌 ddH₂O, 震荡 2 min; 3000 rpm 离心 15 min。上层为水相, 含盐类和水溶性物质, 下层为氯仿层, 收集氯仿层, 转入已称重的称量瓶中, 通风橱吹干氯仿, 剩余部分即为总脂; 分析天平称重, 计算细胞中总脂的含量。用薄层层析板回收总脂中的甘油三酯, 在薄层层析板的一端约 0.5 cm 处画一直线, 将提取的总脂样品溶于适量氯仿中, 滴加于此线上, 反复多次至样品加完, 这样所加的样品形成一条直线, 与普通薄层层析法一样进行展开(不喷硫酸显色)。然后, 将与三油酸甘油酯标准品(Sigma)对应的层析线切割, 用小刀将硅胶粉刮下, 放入玻璃离心管中, 用 10 - 20 mL 甲醇离心洗脱, N₂ 吹干, 分析天平称重, 计算细胞中甘油三酯的含量。最后确认获得 4 个产油突变株(图 4)。其中两株(藻株 3-1667 和 4-2411) 含油量(甘油三酯含量) 比野生型(wt) 分别提高了 4.58% 和 4.69%, 两株(藻株 3-2734 和 4-2560) 含油量比野生型分别降低了 7.87% 和 3.76%。

[0020] ④细胞中甘油三酯测定和脂肪酸分析

产油突变藻株是否适合作为生物柴油原料的重要依据之一是甘油三酯的脂肪酸组成。取 3-1667、4-2411、3-2734、4-2560 和野生型(wt) 对照 5 株藻提取总脂, 再利用薄层层析方法分离纯化出甘油三酯, 以气相色谱分析其脂肪酸组成成分(表 1)。与野生型相比, 突变藻株 3-1667、3-2734 和 4-2560 中 C16:0 含量下降而 C16:1 和 C20:5 含量升高。突变株 4-2411

的C16:0组成比野生型有小幅度增加,其C20:5组成却大幅降低;三个以上不饱和键的脂肪酸含量不足1%。因此突变株4-2411不仅比野生型含油量高,其甘油三酯中多不饱和脂肪酸比例显著降低,有利于生物柴油的稳定性。

[0021] 表1 三角褐指藻突变藻株和野生型细胞甘油三酯中脂肪酸组成(摩尔百分比)

脂肪酸	藻株名称				
	3-1667	4-2411	3-2734	4-2560	野生型
C14:0	5.21±0.09	4.63±0.67	5.66±0.24	6.24±0.25	5.56±0.18
C14:1	0.01±0.00	0.04±0.06	0.02±0.01	0.01±0.01	0.05±0.04
C16:0	26.85±0.57	42.12±2.21	24.9±0.33	24.6±0.10	37.98±1.72
C16:1	55.89±0.21	48.97±1.54	59.09±0.55	57.19±1.67	49.44±1.51
C18:0	0.59±0.11	1.20±0.09	0.48±0.04	0.69±0.31	0.74±0.02
C18:1	2.79±0.70	1.78±0.16	1.63±0.04	2.74±0.88	1.74±0.06
C18:2	1.17±0.16	0.73±0.32	1.01±0.16	1.67±0.39	0.74±0.02
γ-C18:3	0.12±0.01	0.06±0.06	0.13±0.01	0.14±0.02	0.26±0.02
α-C18:3	0.76±0.03	0.13±0.07	0.60±0.04	0.88±0.01	0.11±0.01
C18:4	0.42±0.05	0.02±0.02	0.27±0.03	0.30±0.01	0.23±0.01
C20:0	0.01±0.01	0.01±0.02	0.01±0.01	0.01±0.02	0.01±0.00
C20:3	0.08±0.01	ND	0.07±0.01	0.15±0.02	0.08±0.01
C20:4	0.01±0.01	ND	0.03±0.01	0.02±0.02	0.07±0.01
C22:0	0.11±0.02	ND	0.07±0.02	0.05±0.06	0.02±0.00
C20:5	5.83±0.43	0.32±0.10	5.67±0.74	5.20±0.28	2.93±0.06
C22:6	0.18±0.16	ND	0.39±0.03	0.11±0.13	0.09±0.13

⑤产油突变株的生长测定

分别取3-1667、4-2411、3-2734和4-2560接种培养,每个藻株设三个平行,接种起始OD₇₅₀值为0.025,置于光照培养箱中,在温度为20℃,单侧光强为80 μmol photons/m² s连续光照条件下通空气培养,隔天测定一次OD₇₅₀值,4株产油突变株与野生型(wt)相比较,其中两株高产油突变株(图5上面两条曲线)的生长速率与野生型相当,两株低产油突变株生长比野生型缓慢(图5下面两条曲线)。

[0022] 实例一中所选突变株4-2411为高产油株,其甘油三酯含量不仅比野生型高了4.69%,脂肪酸组成中多不饱和脂肪酸比例也较野生型大幅度下降,达到欧盟所制定的标准,除了不需要饱和修饰节省的成本。根据保守估计,产油藻甘油三酯每增加1%的含量,每年每公顷就要多产出400L的生物柴油,以现有的石油柴油价格7.5元/L为标准,以突变株4-2411为原料生产生物柴油,每年单位面积至少要节省产值14070元左右。

[0023] 二、利用三角褐指藻(*P. tricornutum*) 构建随机插入突变体库,以气相色谱法分析突变株脂肪酸组成,还可以筛选并获得 EPA 含量和比例大幅提升的突变株,突变株 3-1667 的 EPA 比例是野生型的二倍,生长却没受影响。所选突变株如果用于生产 EPA,则会带来比原有野生型藻株两倍的产量和利润。

[0024] 三、利用小环藻(*Cyclotella cryptica*),和实例一和二类似的方法,构建随机诱变突变体库。以中性脂荧光和叶绿体荧光比值法进行大量筛选产油率提高 / 脂肪酸饱和度降低的突变株,或者以气相色谱法检测筛选,获得 EPA 含量大幅提升的突变株。

[0025] 四、利用舟形藻(*Navicula saprophila*) 和实例一和二类似的方法,构建随机诱变突变体库。以中性脂荧光和叶绿体荧光比值法进行大量筛选产油率提高 / 脂肪酸饱和度降低的突变株,或者以气相色谱法检测筛选,获得 EPA 含量大幅提升的突变株。

序列表

<110> 中国科学院水生生物研究所 ;中国石化股份有限公司

<120> 一种用于改良硅藻产油遗传特征的方法

<140>

<141>

<160> 6

<210> 1

<211> 24

<212> 引物 -1

<400> 5' AGGACGCAATGGAGGATTATCACC 3'

<210> 2

<211> 20

<212> 引物 -2

<400> 5' CTCTGCCTAGCCTACACGAC 3'

<210> 3

<211> 28

<212> 引物 -3

<400> 5' CTAGATATCAAGATGGCCAAGTTGACCA 3'

<210> 4

<211> 25

<212> 引物 -4

<400> 5' GATAAGCTTCAGTCCTGCTCCTCGG 3'

<210> 5

<211> 20

<212> 引物 -5

<400> 5' AAAGTGAGGAAGGCACAGGA 3'

<210> 6

<211> 29

<212> 引物 -6

<400> 5' CTTGATATCCTTGACTTCGAAATATGCGC 3'

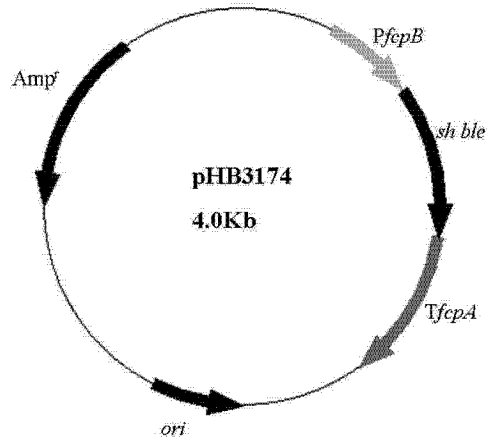


图 1

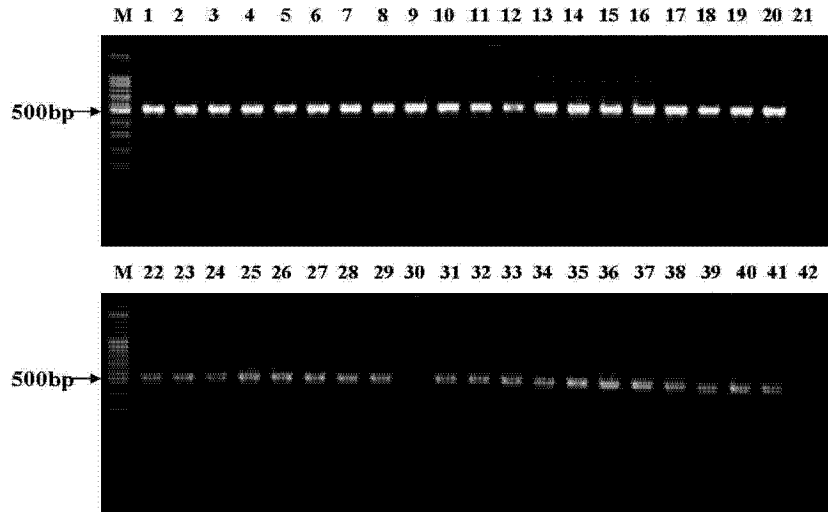


图 2

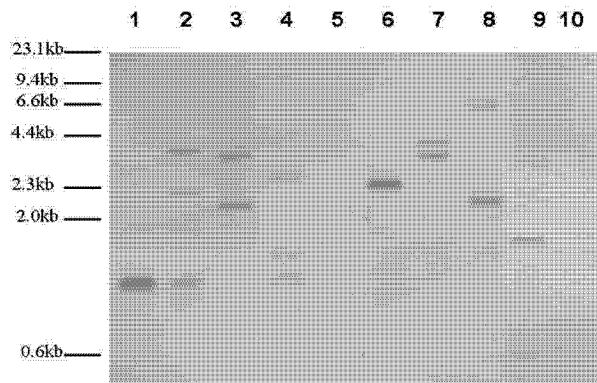


图 3

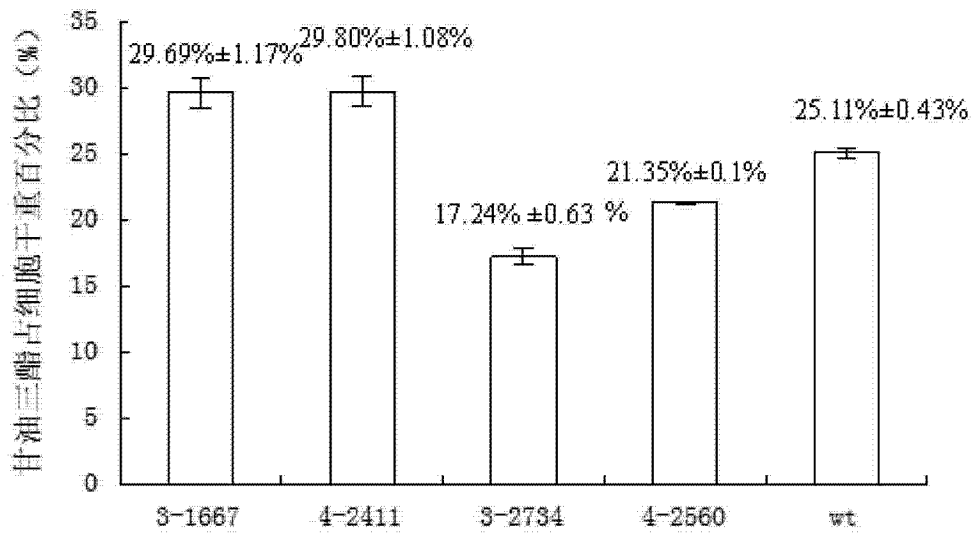


图 4

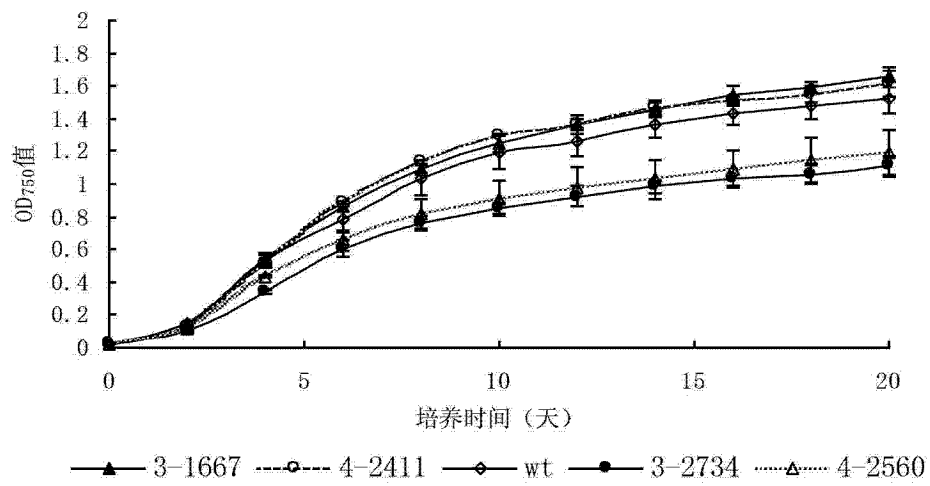


图 5