

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01134

螺旋藻耐盐相关基因启动子区功能分析

李姗姗¹, 雍静茹¹, 齐云玲¹, 章颖¹, 赵亮¹, 夏士林¹, 李东², 王慧利¹, 包其郁¹, 李佩珍²

1. 温州医学院检验医学与生命科学学院, 温州 325000;
2. 温州医学院生物学实验教学中心, 温州 325000

摘要: 文章利用绿色荧光蛋白基因作为报告基因, 研究 2 个螺旋藻耐盐相关基因启动子区域的功能。通过启动子预测软件预测螺旋藻耐盐相关基因 5'端非翻译区的启动子结构, 用 Primer3.0 程序在线设计引物, 以 pMD18-T 载体和 pUC18 载体克隆螺旋藻启动子序列、*gfp* 和卡那霉素抗性基因, 将螺旋藻启动子-GFP 基因-卡那霉素抗性基因(*pro-gfp-kan^r*)三联 DNA 片段克隆至 pKW1188 载体, 并将该重组质粒 pKW1188::*pro::gfp::kan^r* 转化至受体菌集胞藻 6803, 激光共聚焦显微镜观察不同盐浓度培养条件下、不同时间段集胞藻表达 GFP 的情况。结果显示, 通过不同盐浓度和不同时间的诱导, 2 个螺旋藻启动子在 0.4~0.6 mol/L NaCl 条件下, 培养 6~8 h 表达的绿色荧光蛋白最多。文章成功构建了以绿色荧光蛋白为报告基因、卡那霉素抗性基因为选择标记、集胞藻 6803 作为外源基因表达受体, 进行螺旋藻耐盐相关基因功能研究的平台; 另外, 从螺旋藻启动子能被盐诱导大量表达 GFP 的结果看, 与启动子相关的螺旋藻基因很可能与螺旋藻的耐盐性相关。

关键词: 绿色荧光蛋白; 螺旋藻; 启动子; 集胞藻; 耐盐相关基因

Functional analysis of promoter fragments of salt-tolerance related genes in *Spirulina*

LI Shan-Shan¹, YONG Jing-Ru¹, QI Yun-Ling¹, ZHANG Ying¹, ZHAO Liang¹, XIA Shi-Lin¹, LI Dong², WANG Hui-Li¹, BAO Qi-Yu¹, LI Pei-Zhen²

1. School of Labtory and Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;
2. Biological Experiment Teaching Center of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Abstract: In this work, the functions of promoter fragments of two potential salt-tolerance related genes of *Spirulina* (*Spirulina platensis* Geitl.) were studied using green fluorescent protein gene (*gfp*) as a reporter. The promoter structures of two salt-tolerance related genes of *Spirulina* were predicted using online promoter prediction software. pMD18-T and pUC18 vectors were used to clone the promoter sequences as well as the *gfp* gene and kanamycine resistance (*kan*) gene. The fragments containing *pro-gfp-kan^r* were further cloned into pKW1188 vector and the resulting recombinant plasmids were then transformed into a host strain *Synechocystis* sp. (*Synechocystis pevalekii* Ercegovic) PCC6803. The resulting bacterial strains were grown under various concentrations of salinity for defining time intervals. The bacterial fluorescence was ob-

收稿日期: 2011-03-28; 修回日期: 2011-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30571009, 31071115)和浙江省科技计划项目(编号: 2009C33040)资助

作者简介: 李姗姗, 在读本科, 专业方向: 临床检验诊断学。E-mail: 403855797@qq.com

通讯作者: 李佩珍, 硕士, 实验师, 研究方向: 分子生物学。E-mail: lpz0522@126.com

网络出版时间: 2011-8-22 10:05:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110822.1005.004.html>

served using laser confocal microscope. Our results showed that the transgenic bacteria grown at different concentrations of salinity for various periods produced varying fluorescence intensities. The bacteria treated with NaCl at the concentrations of 0.4mol/L to 0.6mol/L for 6 to 8 h showed the strongest fluorescent intensity. From the result of high salt induced expression of *gfp*, we predicted that the genes under control of these two promoters are likely to play important roles in the salt tolerance of *Spirulina*. Accordingly, we believed that a research platform for the studying functions of the promoters of the salt-tolerance related genes in *Spirulina* has been developed with the *gfp* as a reporter, the *kan^r* gene as the selection marker, and *Synechocystis*. sp. PCC6803 as the expression host.

Keywords: green fluorescent protein; *Spirulina*; promoter; *Synechocystis*.sp.PCC6803; salt-tolerance related gene

螺旋藻(*Spirulina*) 属于蓝藻门(Cyanophyta)、蓝藻纲(Cyanophyceae)、颤藻目(Oscillatoriales)、颤藻科(Oscillatoriaceae)、螺旋藻属(*Spirulina* 或 *Arthrospira*), 是一类进化历史悠久、革兰氏染色阴性、无鞭毛、含叶绿素a(但不形成叶绿体)、能进行产氧性光合作用的大型原核生物, 广泛分布于自然界的陆地、淡水域和海洋中, 甚至在岩石表面也能发现它们的踪迹。螺旋藻能够耐受强光、强碱和高盐等极端条件, 其最适钠离子浓度为 150~200 mmol/L, 可耐 1 mol/L 的 NaCl^[1,2]。极强的耐盐能力、简单的细胞结构以及便利的培养条件使人们对螺旋藻的耐盐机理产生了浓厚兴趣, Wiangnon 等^[3]发现 *Aphanothece halophytica* 包膜存在钠诱导型 ATP 酶与蓝细菌的耐碱性有关, 方孝东等^[4~6]认为盐藻在受到高渗刺激时, 转铁蛋白和碳酸脱水酶基因表达增强。虽然国内外都开展了对蓝细菌抗盐碱等抗性机制的研究, 但迄今还没有学者从基因组、蛋白组水平比较系统地研究螺旋藻抗盐碱分子机理。前期研究中, 在本课题组完成的螺旋藻全基因组序列图的基础上, 采用蛋白组学方法分离和鉴定了螺旋藻耐盐胁迫反应相关蛋白, 并通过质谱分析筛选出螺旋藻在受到盐胁迫时差异表达最明显的 2 个基因(本课题组未发表数据)。为进一步验证这 2 个基因的功能, 本研究中我们选择遗传背景清楚便于进行基因序列和功能分析的集胞藻 6803 作为外源基因表达受体, 其全基因序列已经于 1996 公布^[7], 以 *gfp* 为报告基因, 构建相应的集胞藻 6803 同源重组双交换整合平台, 开展启动子表达调控研究。通过分析不同的启动子在集胞藻 6803 的相对转录起始效率, 为筛选高效表达启动子提供参考依据, 为拓建耐盐基因资源库, 揭示耐盐分子机制, 以及耐盐植物的分

子育种等进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pMD18-T 质粒、基因重组各种工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司, pUC、pET-28a 质粒为本实验室保存, pKW1188 质粒为本校王慧利老师惠赠, 螺旋藻、大肠杆菌 JM109 为本实验室保存, 含 GFP 基因的细菌为浙江大学吴敏教授惠赠, 集胞藻购自中科院武汉水生所, PCR 纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒为艾思进公司产品, 引物合成由上海捷瑞公司完成, 激光共聚焦显微镜 FV1000 购自日本 Olympus 公司, 荧光分光光度计 RF-5301PC 购自日本 Shimadzu 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据螺旋藻耐盐性蛋白组研究结果, 筛选出 2 个在高盐(1 mol/L)环境下明显上调的螺旋藻基因(分别命名为 *spi-049*、*spi-295*)。根据螺旋藻基因组序列的注释结果, 找到这 2 个基因的对应基因组序列, 再用 online promoter system 预测基因上游序列中的启动子序列, 用在线引物软件 primer3.0 设计 2 对扩增启动子片段引物, 扩增片段长度为 200 和 250 bp, 分别在各启动子引物上游 5'端加入 *Xba* 的酶切位点, 引物下游加入绿色荧光蛋白(GFP)基因 5'端部分序列(表 1); 在 GFP 基因的上游引物 5'端加入启动子 3'端的部分序列, 在 GFP 基因的下游引物 3'端加入 *Bam* H 的酶切位点(表 1)。在卡那霉素抗性基因引物的上下游分别加 *Bam* H 和 *Hind* 酶切位点。

表 1 螺旋藻启动子区、绿色荧光蛋白基因和卡那霉素抗性基因的引物

引物 *	序列(5'→3')	长度(bp)
<i>pro-spi-049</i>	F1 : GTCTAGAGATTGATCGGTGTTGACAGACCG R1 : AGTTCTTCTCCTTTACTCATTGGGATTGTCAGAACTCTGTTGA	200
<i>pro-spi-295</i>	F1 : GTCTAGACTTCGGGCGCTCGCTTCTTTAAA R1 : AGTTCTTCTCCTTTACTCATGAAAATCAGAATTGAATGGTCTAA	250
<i>gfp-049</i>	F2 : ACAGAGTTCTGACAATCCCAATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCAC R2 : GGGATCCTTATTTGTATAGTTTCATCCATGCCA	718
<i>gfp-295</i>	F2 : ACCATTCAATTCTGATTTTCATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCAC R2 : GGGATCCTTATTTGTATAGTTTCATCCATGCCA	718
<i>kan^r</i>	F3 : AGGATCCTTTGATCTTTTCTA R3 : TAAGCTTAGAAAACTCATCGAGCATC	800

注: * *pro-spi-049*:螺旋藻预测启动子 049 的重组 PCR 引物; *gfp-049*: 绿色荧光蛋白与螺旋藻预测启动子 049 重组 PCR 的引物。

1.2.2 螺旋藻、集胞藻总 DNA 的提取

螺旋藻总DNA提取采用液氮研磨法^[8]。集胞藻 PCC6803 总DNA按徐旭东等(1993)^[9]描述的方法提取。

1.2.3 启动子序列、GFP 基因和卡那霉素抗性基因的扩增

启动子序列的 PCR 扩增:以螺旋藻基因组 DNA 为模板,利用上述表 1 的 2 对引物(各启动子的 F1 和 R1)分别扩增相应的启动子序列,条件为:94 预变性 5 min, 94 变性 40 s, 60 复性 30 s, 72 延伸 40 s, 共 35 个循环, 72 延伸 10 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳检测,切下所需目的条带试剂盒回收后备用。

GFP 基因的 PCR 扩增:以含 GFP 基因的单菌落为模板,利用上述表 1 的 2 对引物(各启动子对应的 F2 和 R2)分别扩增 GFP 的开放阅读框,条件为:94 预变性 5 min, 94 变性 40 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 40 s, 共 35 个循环, 72 延伸 10 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳检测,切下所需目的条带试剂盒回收后备用。

重组 PCR 获得启动子序列与 GFP 基因重组片段 *pro-gfp*:以启动子和 GFP 基因 PCR 扩增产物为模板,利用 2 对引物(表 1 中的各启动子对应的 F1 和 R2 引物)进行重组 PCR 扩增,条件为:94 预变性 5 min, 94 变性 40 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 40 s, 共 35 个循环, 72 延伸 10 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳检测,切下所需目的条带试剂盒回收后备用。

卡那霉素抗性基因的PCR扩增:以含卡那霉素

抗性基因的pET-28a质粒为模板,利用卡那霉素抗性基因引物进行PCR扩增 kan^r 的开放阅读框,条件为:94 预变性 5 min, 94 变性 40 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 40 s, 共 35 个循环, 72 延伸 10 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶中电泳检测,切下所需目的条带试剂盒回收后备用。

1.2.4 PCR 产物的克隆与测序验证

将启动子序列与GFP基因的重组PCR产物以及卡那霉素抗性基因片段分别与pMD18-T载体连接,16℃过夜,反应产物转化入感受态大肠杆菌JM109,在含氨苄青霉素平板上通过蓝白斑结合菌落PCR筛选获得阳性克隆(pMD18-*pro::gfp*和pMD18-*kan^r*重组子),提取质粒经双酶切鉴定后送生物公司测序。

1.2.5 构建pUC-*pro::gfp::kan^r*重组子

根据各自的酶切位点,用*Xba* 和*Bam*H 双酶切下pMD18-*pro::gfp*上的*pro::gfp*片段,用*Bam*H 和*Hind* 双酶切下pMD18-*kan^r*上的卡那霉素抗性基因。同时,用*Xba* 和*Hind* 双酶切pUC18 载体。将其连接,构建pUC-*pro::gfp::kan^r*重组子,16 过夜,反应产物转化入JM109(感受态),通过蓝白斑筛选获得阳性克隆,并提取质粒双酶切鉴定。

1.2.6 构建pKW-*pro::gfp::kan^r*重组子

用*Eco*R 将pKW1188 质粒进行酶切,然后补平末端,去磷酸化。同时,用*Xba* 和*Hind* 从pUC-*pro::gfp::kan^r*重组质粒中切下*pro::gfp::kan^r*片段,末端补平后,将其与末端补平去磷酸化的pKW1188 载体链接,构建pKW-*pro::gfp::kan^r*重组

质粒, 经卡那霉素抗性筛选获得阳性克隆。提取质粒PCR鉴定。将经过抗性筛选和PCR鉴定的菌落扩大培养, 提取重组质粒备用。

1.2.7 集胞藻的自然转化

根据文献报道, 利用自然转化法^[9]进行, 具体步骤如下: 将混合纤维酯膜以蒸馏水浸泡 3 次, 每次 5 min; 煮沸 3 min, 之后置玻璃培养皿中灭菌待用, 初始接种浓度的 OD_{730} 约为 0.2, 生长 2 d左右使藻的光密度(OD_{730})为 0.5~1.0 时, 取 10 mL的藻液, 离心(6 000 r/min, 5 min), 用新鲜BG-11 洗涤一次并重悬于BG-11 中, 取 0.1 mL细胞悬液与相应的重组质粒pKW-*pro::gfp::kan^r*在 30℃混匀, 在光照下温育 4 h后涂于覆有混合纤维酯膜的BG-11 平板。光照培养 1 d后, 将膜转到含 10 μg/mL卡那霉素的平板上, 并给予不同的高渗环境继续光照培养, 野生藻在抗生素筛选压力下逐渐死亡, 7~10 d后在滤膜上会长出转基因藻的单克隆。

1.2.8 转化子检测^[10]

利用 PCR 扩增检测。集胞藻通气培养至对数生长期, 然后提取染色体 DNA。以染色体 DNA 作为模板, *gfp* 对应引物作为引物, 进行 PCR 扩增试验。发生了同源重组交换的转基因藻染色体上含有目的基因, 因此可以扩增出 *gfp* 对应大小的 DNA 片段条带。

1.2.9 荧光检测

用 40 μL 生理盐水洗下混合纤维酯膜上的转基因藻, 混合后滴加到载玻片上, 用盖玻片压薄成标本片。将制好的标本片先用光学显微镜观察, 再用激光共聚焦显微镜, 在 488 nm 的激发波长下观察。以野生集胞藻 6803 作为对照扣除背景, 观察有转化子的集胞藻 6803 的绿色荧光, 同时拍照记录保存图片。

1.2.10 不同盐浓度下 GFP 的诱导表达

取 250 mL起始浓度为 $OD_{730}=0.6\sim 1.0$ 的转基因集胞藻, 分装成 12 份, 每份 20 mL, 分成两组, 每组 6 份。在各组不同管中依次加入NaCl溶液, 使终浓度分别为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L。再各取 3 mL相同藻浓度未经转化的集胞藻 6803 作为对照组。将 3 组都放在 30℃持续光照的环境下培养 12 h, 以加入盐的那一刻开始计时, 在 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h共 7 个时间点分别对转基因集胞藻

进行取样制标本片, 通过激光共聚焦显微镜直接活体观察绿色荧光强度并拍照。再取各条件下的 2 mL转基因藻置于超声波细胞破碎仪破碎细胞壁, 使用荧光分光光度计进行定量分析。重复 3 次取平均值, 统计学分析使用SPSS 17.0 软件。

2 结果与分析

2.1 螺旋藻耐盐相关基因启动子序列的预测

根据螺旋藻在不同盐浓度下蛋白组分析结果, 选取 2 个在高盐浓度下高度表达的螺旋藻基因为研究对象。应用在线 promoter system(<http://www.softberry.ru/berry.phtml>)对 2 个基因的 5'端非翻译区的 300 bp 范围内进行启动子序列分析, 结果表明在 2 个基因(*spi049*、295)的 5'端非翻译区内都预测到类似于 TATA-box、CAAT-box 和多个富含 GC 的区域等启动子的特征元件(图 1)。在 2 个基因的 5'端非翻译区 200~300 bp 设计 PCR 引物, 进行 PCR 扩增。

2.2 载体pKW-*pro::gfp::kan^r*的构建及转化子检测

以螺旋藻耐盐相关基因启动子(*pro*)的PCR产物和*gfp*为模板, 用螺旋藻耐盐相关基因启动子的上游引物和GFP基因下游引物进行重组PCR扩增, 结果得到片段大小约为 1 000 bp的条带(*pro::gfp*, 启动子和GFP基因序列的总和), 与预期的结果相符。将重组PCR产物及卡那霉素抗性基因PCR产物分别克隆至pMD18-T载体, 经测序鉴定正确后, 再将两者各自双酶切后, 将目的片段一并克隆至pUC18 载体, 得到pUC-*pro::gfp::kan^r*。pUC-*pro::gfp::kan^r*重组质粒用*Xba* 和*Hind* 双酶切后, 可见约 2.7 kb和 1.8 kb 大小的条带, 回收 *pro::gfp::kan^r* 片段, 克隆至 pKW1188 载体, 转化后在含卡那霉素平板上筛选含重组子pKW-*pro::gfp::kan^r*菌株, 提取质粒进行PCR鉴定, 最后得到含螺旋藻*spi-049*、*spi-295* 基因启动子的重组质粒pKW-*pro::gfp::kan^r*。

转基因藻染色体 DNA 经 PCR 扩增出现一特异性条带, 大小与阳性对照片段(*gfp*)一致, 而野生藻中不存在相应片段, 证明转化成功。

2.3 GFP 蛋白在集胞藻 6803 中的表达

野生集胞藻在正常培养条件、高低盐环境中都不能产生绿色荧光(图 2A)。转化质粒pKW-*pro::gfp::kan^r*的转基因集胞藻细胞, 在正常培养条件、高

pro-spi-049:

```

1   CTGAAA.....TGATCTGGGGGTCTCCCAAATGCACCCATGATACATCCCAGATT
      -35                      -10
105 GATCGGTGTTGACAGACCGGGAATCTAGTAATCTTAGGCACGGTGGTATGTCAA
159 AATGAA.....AGCCAGTAGAGAATTTAGACACTAGCCTTAAAAATCAACAGAGT
287 TCTGACAATCCCATG
      start codon
  
```

pro-spi-295:

```

1   AATAGG.....ATTGCTCGAGTGGGAGTCAATTTGTAATTGTTTCCTTACAATCGG
      -35                      -10
173 ATGAATCAGGAAATGCAGCGGATTAACCGCATGGGTGGTAAATTTGTTAGCAT
226 TGAGCCGATGACTACCGATAATACGGTGTCTGAAGCTGAGGGCGAATAATTTA
279 GACCATTCAATTCTGATTTTATG
      start codon
  
```

图 1 预测的螺旋藻启动子序列

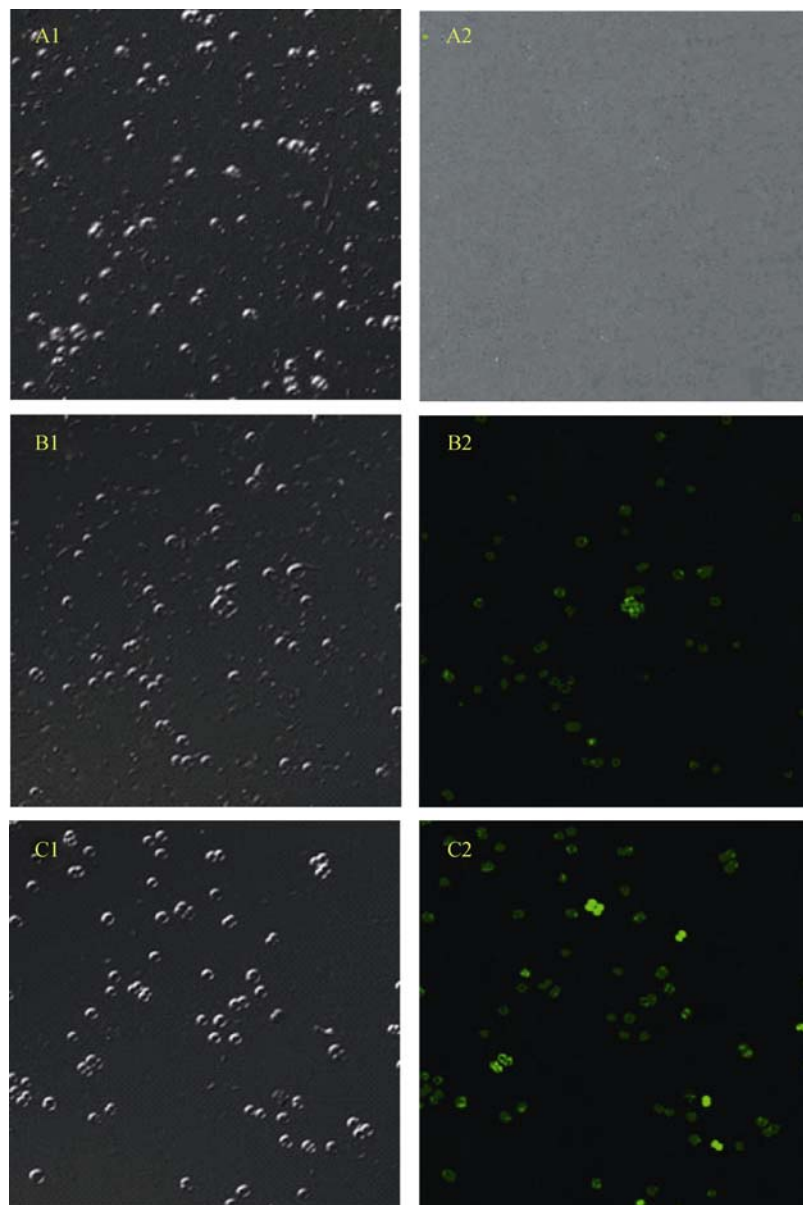


图 2 绿色荧光蛋白在 *S. PCC6803-pro::gfp::kan^r* 中的表达

A1、A2: PCC6803; B1、B2: *pro-spi-049*; C1、C2: *pro-spi-295*。

低盐环境中培养后均能检测到绿色荧光。由此可见,质粒的上、下游集胞藻基因组同源臂与藻细胞染色体发生同源重组交换,结果使启动子序列、GFP基因和卡那霉素抗性基因(*pro::gfp::kan^r*)整合到染色体上(*S.PCC6803-pro::gfp::kan^r*),启动子启动GFP基因的转录表达,使细胞检出绿色荧光(图 2B、C)。经不同浓度的NaCl刺激一定时间后,经激光共聚焦显微镜检出,结果显示含启动子*pro-spi-049*的集胞藻在0.4 mol/L NaCl条件下培养 6 h时荧光表达最强,含启动子*pro-spi-295*的集胞藻在 0.6 mol/L NaCl条件下,培养 8 h时荧光表达最强,说明不同螺旋藻基因的启动子,在不同盐浓度和作用时间下,可诱导受其调控基因的不同水平的表达(表 2, 表 3, 图 3)。

表 2 含 049 启动子的集胞藻转化子的诱导结果

诱导时间 (h)	盐浓度 (mol/L)					
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
0	+	+	+	+	++	++
2	++	++	+++	++	++	++
4	+++	++	++	+	+	+
6	++	++	++++	++	++	+
8	+	++	++	+	++	+
10	++	+++	+++	++	+	+
12	++	++	++	+	+	+

注：阴性和阳性强弱见图 3。

表 3 含 295 启动子的集胞藻转化子的诱导结果

诱导时间 (h)	盐浓度 (mol/L)					
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
0	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	++	+	+
4	+	+	+	++	++	+
6	+	+	++	+++	+++	++
8	+	++	++	++++	+++	++
10	+	+	+	++	++	+
12	+	+	+	++	+	+

注：阴性和阳性强弱见图 3。

通过荧光分光光度计进行荧光定量,发现含启动子*pro-spi-049*、*pro-spi-295*的集胞藻的荧光值明显高于野生集胞藻($F=18.852$, $P<0.01$),说明螺旋藻启动子在集胞藻中具有启动活性。含启动子*pro-spi-049*、*pro-spi-295*的集胞藻的最强单位藻量荧光值分别为133.60、220.97,可见启动子*pro-spi-295*的GFP表达较强,与荧光显微镜下的观察结果基本一致。

3 讨论

螺旋藻分布广泛、能够耐受强光、强碱和高盐等极端条件,其最适钠离子浓度为150~200 mmol/L,可耐1 mol/L的NaCl [1,2]。由于螺旋藻可能具备对各种环境胁迫迅速做出反应的特殊调控机制,研究它们对高盐胁迫的适应机制,挖掘螺旋藻的耐盐基因或调控因子,对于构建耐盐性的工业生产用菌和耐盐、耐渗的植物,改造农作物,来开发利用盐碱地和增加粮食产量等方面具有广阔的应用前景。

启动子是决定转录起始的顺式调控元件,通常位于转录起始位点(TSP)上游的-35 bp和-10 bp处,被宿主中的RNA聚合酶识别从而启动转录 [11]。生物体内基因的表达表现为程序性地开放和程序性地关闭,而起关键作用的就是启动子。外源基因在宿主主体内表达与否及表达量都直接与启动子有关。我们应用Online promoter system对螺旋藻的2个耐盐基因的预测启动子序列进行生物信息学分析,表明其具有类似于TATA-box、CAAT-box和多个富含GC的区域等启动子的特征元件。为进一步明确这些启动子在耐盐相关基因表达调控中的作用,本实验对启动子进行了克隆,并利用报告基因技术 [12]对这些启动子的转录活性进行了检测,证实启动子*pro-spi-049*、*pro-spi-295*均具有转录活性,且可被NaCl诱导。我们以增强型绿色荧光蛋白作为本实验的报告基因,其检测灵敏度高、对机体毒副作用小,无需任何辅助因子和底物的参与,且可准确检测基因表达量 [13],作为报告基因具有其特有的优越性。

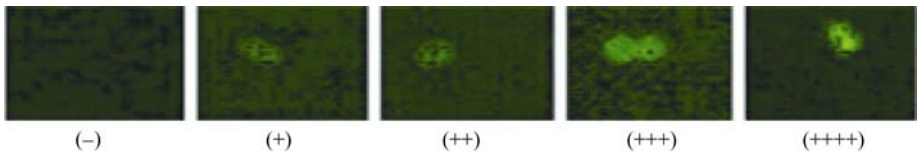


图 3 激光共聚焦显微镜下荧光亮度标准图

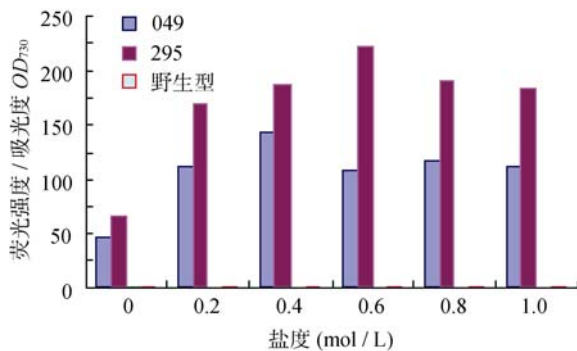


图 4 在不同盐度下, 将重组藻-049 和重组藻-295 分别诱导表达 6 h 和 8 h 后的荧光检测

本研究选集胞藻 6803 基因组 slr0168 基因及其上下游相连的两个片段分别作为上游整合平台(up)和下游整合平台(down), 在中间插入启动子、*gfp* 报告基因、卡那霉素抗性筛选标记, 构建得到同源重组双交换整合平台, 为探索外源蛋白在集胞藻 6803 中表达、高效启动子的筛选等研究提供了很好的转化、表达、筛选及检测平台, 为进一步探讨螺旋藻耐盐基因表达调控和相关信号转导机制提供了一个便捷、灵敏的工具。在下一阶段的研究中我们拟把报告基因 *gfp* 更换成耐盐相关基因, 转化集胞藻 6803 使其高效表达外源蛋白, 验证这些基因在抗逆过程中的作用, 为植物基因工程育种提供新的功能基因, 也为培育抗逆性增强的螺旋藻新品种、挖掘其他藻类抗逆功能相关基因奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Thomas DJ, Sullivan SL, Price AL, Zimmerman SM. Common freshwater cyan bacteria grow in 100% CO₂. *Astrobiology*, 2005, 5(1): 66–74. [DOI](#)
- [2] Ayachi S, El Abed A, Dhifi W, Marzouk B. Chlorophylls, proteins and fatty acids amounts of arthrospira platensis growing under saline conditions. *Pak J Biol Sci*, 2007, 10(14): 2286–2291. [DOI](#)
- [3] Wiangnon K, Raksajit W, Incharoensakdi A. Presence of a Na⁺-stimulated P-type ATPase in the plasma membrane of the alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 270(1): 139–145. [DOI](#)
- [4] 方孝东, 林栖凤, 李冠一, 屈良鹄. 盐藻线粒体 GIY-YIG 族归巢内切酶基因受到盐胁迫时增强转录. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 10(5): 625–629. [DOI](#)
- [5] Fisher M, Gokhman I, Pick U, Zamir A. A structurally novel transferring-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *J Biol Chem*, 1997, 272(3): 1565–1570. [DOI](#)
- [6] Fisher M, Zamir A, Pick U. Iron uptake by the halotolerant alga *Dunaliella* is mediated by a plasma membrane transferrin. *J Biol Chem*, 1998, 273(28): 17553–17558. [DOI](#)
- [7] [Http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/synechocystis/index.html](http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/synechocystis/index.html). [DOI](#)
- [8] 毛云翔, 张宝红, 杨官品, 张学成. 节旋藻 (螺旋藻) 高分子量 DNA 的两种制备方法. *海洋科学*, 2003, 27(2): 32–36. [DOI](#)
- [9] 徐旭东, 王业勤, 黎尚豪. 鱼腥藻-大肠杆菌启动子 CAT 探测载体的构建. *中国科学院研究生院学报*, 1993, 10(2): 203–209. [DOI](#)
- [10] 迪芬巴赫 CW, 德维克斯勒 GS. PCR 实验技术指南. 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 等译. 北京: 科学出版社, 1998: 380–415. [DOI](#)
- [11] McClure WR. Mechanism and control of transcription initiation in Prokaryotes. *Ann Rev Biochem*, 1985, 54: 171–204. [DOI](#)
- [12] Williams JGK. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol*, 1988, 167: 766–778. [DOI](#)
- [13] Hautefort I, Proença MJ, Hinton JCD. Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression *in vitro* and during infection of mammalian cells. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7480–7491. [DOI](#)