

杜氏盐藻异养表达载体的构建及异养转化株的鉴定

陈涛, 刘红涛, 吕鹏举, 薛乐勋

郑州大学生物工程系 细胞生物学研究室, 郑州 450052

摘要: 分别构建杜氏盐藻诱导型和组成型异养表达载体, 筛选并初步鉴定异养转化藻株。通过 RT-PCR 从人胎盘组织中克隆并鉴定人红细胞葡萄糖转运基因(*Glut1*), 构建以诱导型双拷贝碳酸酐酶启动子(DCA)驱动 *Glut1* 表达的中间载体, 然后与筛选标记 Bar 盒连接形成盐藻诱导型异养表达载体 pMDDGN-Bar。此外, 将 pUΩGUS(简称 G5)质粒的 GUS 基因去除, 回收大片段载体后与 *Glut1* 基因连接, 构建以组成型启动子 ubiquitin 驱动的组成型异养表达载体 G5*Glut1*-Bar。通过电击转化法转化盐藻, 使 *Glut1* 得到表达, 筛选具有草丁膦(PPT)抗性的表达 *Glut1* 的盐藻转化株。提取转化株总 RNA, RT-PCR 检测目的基因的整合。克隆获得了 1479 bp 的 *Glut1* 序列, 编码 493 个氨基酸。电泳检测各酶切结果表明 *Glut1*、DCA、*Nos* 和 Bar 盒已依次连接到相应的载体上, 说明异养表达载体构建成功。经 PPT 筛选数周后, 转化藻株生长良好, 而对照野生藻株全部死亡。电泳检测 RT-PCR 产物表明两株转化株在相应位置(约 250 bp 处)出现了较为特异的扩增条带, Blast 同源性分析显示序列与人 *Glut1* 基因的同源性为 100%。诱导型和组成型启动子驱动的盐藻异养表达载体构建成功, *Glut1* 基因确已整合到盐藻的基因组中, 构建的表达载体可用于盐藻中 *Glut1* 基因的表达。

关键词: 杜氏盐藻, 表达载体, 异养, 葡萄糖转运基因

Construction of *Dunaliella salina* heterotrophic expression vectors and identification of heterotrophically transformed algal strains

Tao Chen, Hongtao Liu, Pengju Lü, and Lexun Xue

Laboratory for Cell Biology, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: We constructed inducible and constitutive heterotrophic expression vectors of *Dunaliella salina* (*D. salina*) and identified heterotrophic transformants. A gene encoding a glucose transporter (*Glut1*) was cloned from human placenta tissues by RT-PCR and sequenced. Inducible heterotrophic expression vector pMDDGN-Bar of *D. salina*, which included a duplicated carbonic anhydrase (DCA) promoter and a Bar selectable marker that could drive expression of the *Glut1* gene in *D. salina*, was constructed by molecular biology methods. In addition, we constructed another vector G5*Glut1*-Bar that contained a constitutive ubiquitin promoter, *Glut1* and Bar box. The two expression vectors were introduced into *D. salina* by electroporation method, and then screened the transformants with phosphinothricin (PPT). Total RNA of the transformants extracted was used to analyze the integration of the target gene (*Glut1*) by RT-PCR. The cloned *Glut1* sequence was 1479 bp and encoded 493 amino acids. The results of all enzymes digesting showed that two expression vectors were successfully constructed. After screening by PPT for several weeks, the transformants grew

Received: September 22, 2008; **Accepted:** December 25, 2008

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30600006), the International Cooperation Research Project of Ministry of Science and Technology of China (No. 2007DFA01240).

Corresponding author: Hongtao Liu. Tel: +86-371-65103188; E-mail: liuht1230@126.com

Lexun Xue. E-mail: xuelx@371.net

国家自然科学基金项目(No. 30600006), 科技部国际科技合作项目(No. 2007DFA01240)资助。

well whereas wild-type cells died completely. The result of RT-PCR indicated that two transformants both had an about 250 bp specific band and the sequence homology was 100% compared with the human *Glut1* sequence by Blast analysis. Taken altogether, inducible and constitutive heterotrophic expression vectors of *D. salina* was constructed successfully and the *Glut1* gene was integrated into the genome of *D. salina*. Expression vectors above-mentioned may be used for the expression of the foreign *Glut1* gene in *D. salina*.

Keywords: *Dunaliella salina*, expression vector, heterotrophy, glucose transporter1(*Glut1*)

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*, 以下简称盐藻), 是一种无细胞壁的单细胞真核生物, 它具有如下优点: 操作简便且其表达产物可完成翻译后加工; 高度耐盐, 可抗污染; 培养条件简单且成本低; 营养价值高, 可用来生产多种产品, 如健康食品、口服型疫苗等。盐藻独特的生物学特性使得盐藻成为一种表达外源基因的良好宿主, 并广泛应用于工业生产等领域。

然而, 盐藻在开放式培养体系中容易受到微生物的污染^[1], 易受气候、光照以及营养条件不均衡的限制, 而且昼夜温差和自身的相互遮光也会限制它对光的利用率, 从而制约藻的生长, 这些因素使得盐藻的生长速率难以提高, 也使得它在大规模培养及经济领域中的应用受到了限制, 因而本研究拟通过盐藻的异养途径来解决上述问题。葡萄糖是大多数细胞主要的能量来源, 许多藻类都能以它为碳源进行异养生长, 因此, 本研究将负责转运葡萄糖的葡萄糖转运基因(*Glut1*)转入盐藻细胞, 以使其能够利用葡萄糖进行异养生长。

基于上述设想, 本实验首次报道以驱动 *Glut1* 基因表达的诱导型 DCA 启动子和组成型 ubiquitin 启动子为表达框架, 以编码草丁膦乙酰转移酶的 Bar 基因为筛选标记, 分别构建诱导型和组成型的异养表达载体 pMDDGN-Bar 和 G5*Glut1*-Bar, 筛选并鉴定表达 *Glut1* 基因的异养转化藻株。此研究有助于进一步研究葡萄糖作为碳源对盐藻生长速率的影响及 *Glut1* 基因在异养藻株中的功能, 探索杜氏盐藻自养株及异养株的代谢调控途径, 比较 2 种不同类型的启动子的活性, 为提高杜氏盐藻的生长和繁殖速度, 实现盐藻的大规模培养, 建立杜氏盐藻生物反应器奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109 为本室保存, 载体 pMD18-T 购

自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 盐藻藻株的培养

UTEX-LB1644 藻株购自美国 Texas 大学 Marine Plant Collection。盐藻的培养采用 UTEX 盐藻培养基, 配方组成及浓度为: KNO_3 , 10 mmol/L; NaCl , 1.5 mol/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mmol/L; KH_2PO_4 , 0.4 mmol/L; $\text{FeCl}_3 \cdot \text{EDTA}$, 2 $\mu\text{mol/L}$; CaCl_2 , 0.2 mmol/L; NaHCO_3 , 50 mmol/L; 微量元素: $\text{FeCl}_3 \cdot \text{EDTA}$, 2 $\mu\text{mol/L}$; MnCl_2 , 7 $\mu\text{mol/L}$; CaCl_2 , 0.2 mmol/L; ZnCl_2 , 1 $\mu\text{mol/L}$; CoCl_2 , 1 $\mu\text{mol/L}$; CuSO_4 , 1 $\mu\text{mol/L}$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ 。培养条件: 26°C, 光照强度 4500 lx, 光照周期为 12 h 光照: 12 h 暗培养。

1.1.3 主要试剂

酶、PCR 纯化试剂盒、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa), T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, AMV cDNA 第一链合成试剂盒, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder Mix 购自上海生物工程有限公司, Trizol 购自 Invitrogen 公司, D2000 marker 及 EndoFree Plasmid Kit 无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 各溶液按说明书要求配制。

1.1.4 引物

利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物, 并委托上海博尚生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖转运基因(*Glut1*)的克隆和鉴定

Trizol 试剂法提取人胎盘组织总 RNA, 通过 AMV cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA 第一链, 采用合成的 cDNA 为模板, 根据 GenBank 上登录的 *Glut1* 序列(Accession No. NM_006516)设计扩增全长的引物(含 *Kpn* I 和 *Bam*HI 酶切位点, 表 1)。PCR 反应条件如下: 94°C 预变性 10 min; 然后 94°C 30 s, 56°C 50 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 6 min。回收目的片段, 与 pMD18-T 载体相连构成 pMD*Glut1* 载体, 然后用 *Kpn* I 和 *Bam*HI 酶切, 琼脂糖凝胶电泳

表 1 引物序列相关信息

Table 1 Detailed sequences of primers

Primers	Sequences(5'-3')	Length of PCR products (bp)
<i>Glut1</i>	Forward: GGGGTACCACCATGGAGCCCAGCAGCAAGAA(<i>Kpn</i> I) Reverse: CGGGATCCTCACACTTGGGAATCAG(<i>Bam</i> H I)	1479
<i>Glut1</i>	Forward: TCCCCGGGACCATGGAGCCCAGCAGCAAGAA(<i>Sma</i> I) Reverse: CGAGCTCTCACACTTGGGAATCAG(<i>Sac</i> I)	1479
<i>Glut1</i>	Forward: AGGCTTCGTGCCCATGTATGT Reverse: CTTGGCCCCGTTCTCCTCGTT'	265
<i>Nos</i>	Forward: GCTCTAGACCGATCGTTCAAACATTTGGCA(<i>Xba</i> I) Reverse: GCGTCGACCCCGATCTAGTAACATAGATGAC(<i>Sal</i> I)	258
DCA	Forward: CGAGCTCCAGCAAGTAAAGCACTAGTTAAGGGC(<i>Sac</i> I) Reverse: GGGGTACCCTTGGGACACCGCAAATGGGACGGG(<i>Kpn</i> I)	1377

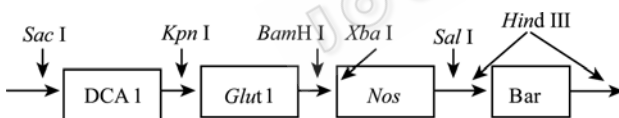
检查酶切情况, 确定插入片段大小, 挑选酶切鉴定正确的克隆进行测序。

1.2.2 中间载体 pMDDGN 的构建

Nos 基因的扩增和碳酸酐酶(DCA)启动子基因的克隆: 利用本实验室已构建好的载体, 设计扩增 *Nos* 终止子和碳酸酐酶(DCA)启动子的引物序列(表 1), 将扩增出的 *Nos* 基因与 pMD*Glut1* 载体相连, 形成 pMDGN 载体, 连接 DCA 启动子, 构建中间载体 pMDDGN 载体。然后转化 JM109, 提质粒, 酶切, 电泳检测。

1.2.3 异养表达载体 pMDDGN-*Bar* 的构建

将本研究小组已有的含 *Bar* 盒的 G12(PBI221-*Bar*)载体利用 *Hind* III 进行单酶切, 回收该 *Bar* 盒与 pMDDGN 载体连接形成异养表达载体 pMDDGN-*Bar*。构建的具体过程见图 1。

图 1 pMDDGN-*Bar* 载体的构建示意图Fig. 1 Schematic illustration of pMDDGN-*Bar* vector.

1.2.4 异养表达载体 G5*Glut1*-*Bar* 的构建

1) 中间载体 G5-*Glut1* 的构建

将 *Glut1* 基因重新设计带 *Sma* I 和 *Sac* I 酶切位点的引物(表 1), 扩增出 *Glut1* 基因, 然后酶切、纯化。将 G5 质粒进行相同酶切, 将两端的 GUS 基因(约 1.9 kb)切除, 回收大片段载体, 与上面纯化的 *Glut1* 进行连接, 构建中间载体 G5-*Glut1*。然后酶切, 电泳检测。

2) 异养表达载体 G5*Glut1*-*Bar* 的构建

将中间载体 G5*Glut1* 利用 *Hind* III 单酶切, 回收 6.5 kb 的载体片段, 与进行同样酶切的 *Bar* 盒

连接, 构建由 ubiquitin 启动子驱动的异养表达载体 G5*Glut1*-*Bar*, 转化, 挑克隆, 提质粒, 酶切鉴定。

1.2.5 电击转化和藻的筛选培养

将上述构建好的载体分别利用无内毒素的大提质粒试剂盒提取质粒, 然后分别将上述质粒电击转化杜氏盐藻细胞, 电击参数为: 电压 0.4 kV, 电容 25 μ F, 电阻 400 Ω , 然后置冰上 5 min, 1000 r/min, 10 min 离心, 倒掉上清中的电击缓冲液, 加入 1 mL UTEX 新鲜培养基重悬, 暗培养 12 h, 然后光照培养至 48 h 后加入 3 μ g/mL PPT 筛选, 以后将 PPT 压力逐渐增至 6 μ g/mL 进行筛选。然后将转化株转移到固体培养板上再筛选, 以保证是单克隆藻株。重复筛选 3~4 代。筛选同时, 设立 2 个对照组: 阴性对照(不加质粒和 PPT)、阳性对照(不加质粒, 加 PPT)。

1.2.6 半定量 RT-PCR

利用 Trizol 试剂法提取盐藻转化株的总 RNA, 电泳检测结果, 以细胞总 RNA 作为模板, 逆转录合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, PCR 扩增目的片段 *Glut1*。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖转运基因(*Glut1*)的克隆和鉴定结果

PCR 扩增出目的片段并回收, 然后与 T 载体相连构成 pMD*Glut1* 载体, 利用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 所插入的片段大小约为 1500 bp(图 2)。将正确的克隆送交上海博尚生物技术有限公司测序, 测序结果通过 NCBI 上的 Blast 进行序列比对, 结果表明所克隆的基因是人葡萄糖转运基因(Glucose transporter1, *Glut1*), 大小为 1479 bp, 编码 493 个氨基酸。

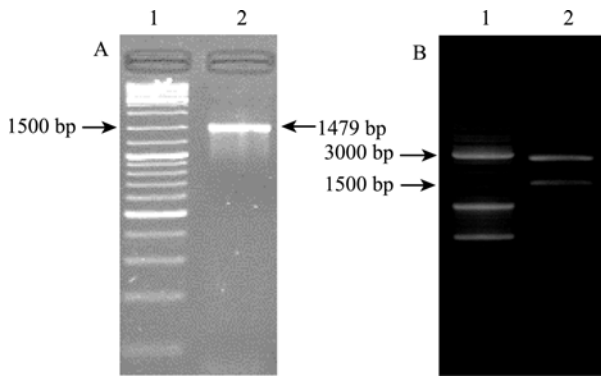


图 2 人 *Glut1* 基因的克隆及鉴定

Fig. 2 Cloning and identification of the human *Glut1* gene. (A) PCR production of *Glut1* gene. 1: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix; 2: *Glut1* gene. (B) Identification of the *Glut1* gene. 1: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix; 2: digestion of pMDGlut1 vector with *Kpn* I and *Bam* H I.

2.2 中间载体表达盒(pMDDGN)的构建

2.2.1 *Nos* 基因的扩增与 pMDGN 的构建

PCR 扩增出 *Nos* 基因后, 胶回收(图 3A), 酶切, 纯化, 与 pMDGlut1 载体连接构成 pMDGN。利用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测, *Nos* 片段为 258 bp, 并得到载体带(约 3000 bp)和 *Nos*+*Glut1* 带(约 1700 bp)(图 3B), 结果与预期相同。

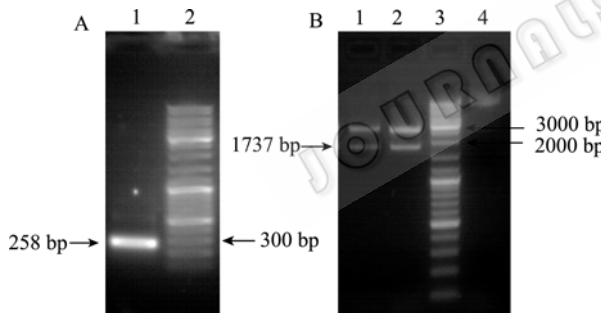


图 3 重组载体 pMDGN 的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant pMDGN. (A) PCR production of *Nos* gene. 1: *Nos*; 2: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix. (B) Identification of recombinant vector pMDGN. 1, 2: digestion of vector with *Kpn* I and *Hind* III; 3: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix; 4: plasmid control.

2.2.2 *DCA* 基因的克隆与中间载体表达盒(pMDDGN)的构建

PCR 结果经琼脂糖凝胶电泳检测, *DCA* 片段约为 1400 bp。胶回收, 酶切纯化后与 pMDGN 连接, 构建中间载体 pMDDGN。经 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切, 电泳检测得到 pMDGN 带和 *DCA* 片段(1369 bp), 如图

4, 结果表明中间载体构建成功。

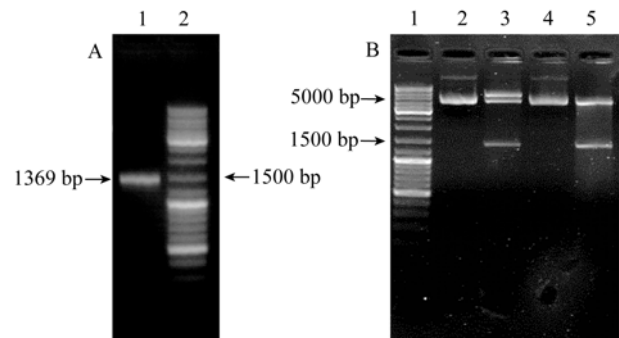


图 4 重组载体 pMDDGN 的酶切鉴定

Fig. 4 Restriction analysis of recombinant pMDDGN. (A) PCR production of *DCA* promoter. 1: *DCA*; 2: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix. (B) Identification of recombinant vector pMDDGN. 1: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix; 2, 4: plasmid control; 3, 5: digestion of vector with *Kpn* I and *Sac* I.

2.3 异养表达载体 pMDDGN-Bar 构建

利用 *Hind* III 单酶切 G12 质粒, 电泳检测切下的 *Bar* 盒约 2000 bp(图 5A)。胶回收 *Bar* 盒, 纯化, 与用同种酶酶切纯化的 pMDDGN 连接, 构建表达载体 pMDDGN-Bar, 电泳检测酶切结果, 得到 2 条带: pMDDGN 载体带(约 5700 bp)和 *Bar*(约 2000 bp)(图 5B), 与预期一致, 表明载体构建成功。

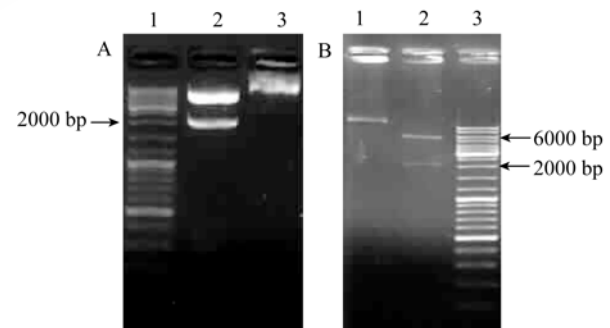


图 5 异养表达载体 pMDDGN-Bar 的构建

Fig. 5 Construction of heterotrophic expression vector pMDDGN-Bar. (A) Digestion of plasmid G12. 1: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix; 2: digestion of G12 with *Hind* III; 3: plasmid control. (B) Identification of heterotrophic expression vector pMDDGN-Bar. 1: plasmid control; 2: digestion of pMDDGN-Bar with *Hind* III; 3: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix.

2.4 异养表达载体 G5Glut1-Bar 的构建

重新设计引物, PCR 扩增 *Glut1* 基因。G5 质粒进行相同酶 *Sma* I 和 *Sac* I 酶切, 回收大片段载体(约 5000 bp), 构建中间载体 G5-*Glut1*, 酶切后电泳检测如图 6A。再与纯化的 *Bar* 连接构建表达载体

G5Glut1-Bar。经 *Hind* III 酶切, 电泳检测, 得到中间载体带(约 6500 bp)和 Bar(2000 bp)(图 6B), 与预期一致, 表明载体构建成功。

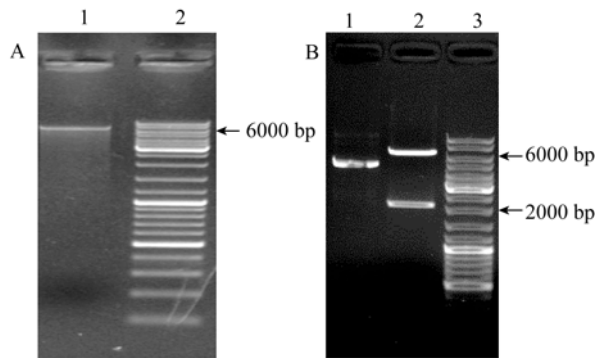


图 6 异养表达载体 G5Glut1-Bar 的构建

Fig. 6 Construction of heterotrophic expression vector G5Glut1-Bar. (A) Digestion of recombinant vector G5Glut1 with *Hind* III. 1: digestion of G5Glut1 with *Hind* III; 2: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix. (B) Identification of heterotrophic expression vector G5Glut1-Bar. 1: plasmid G5Glut1-Bar; 2: digestion of G5Glut1-Bar with *Hind* III; 3: DNA marker, Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix.

2.5 转化藻株的筛选

用电击法将质粒 pMDDGN-Bar 和 G5Glut1-Bar 分别转化杜氏盐藻细胞, 加入终浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PPT 进行筛选, 1 周后, 与对照野生型相比, 转化藻株生长良好, 而对照组藻株基本上全部死亡(图 7)。然后将其扩大培养后做进一步的分子生物学鉴定。

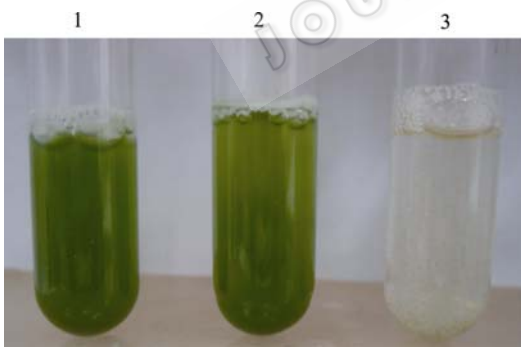


图 7 转化藻株的液体筛选

Fig. 7 Liquid selection of transformed *D. salina* with PPT. 1: transformants with pMDDGN-Bar; 2: transformants with G5Glut1-Bar; 3: wild-type *D. salina*.

2.6 转化藻株的鉴定

提取各转化藻株的总 RNA, 并反转录为 cDNA, 以该 cDNA 为模板, 用 *Glut1* 基因的上下游引物进行 PCR 反应检测外源基因是否整合到基因组中。整合有外源基因的藻株, PCR 产物中应含有相应大

小的片段(265 bp)。对 2 株转化株分别进行 *Glut1* 基因的检测, 结果表明 2 株转化株在相应大小的位置出现了较为特异的扩增条带(图 8), 分别回收特异条带并测序, Blast 结果显示所扩增序列与来源于人的 *Glut1* 基因的同源性为 100%(图 9), 这些结果表明外源基因 *Glut1* 已整合到这些转化藻株的基因组中。

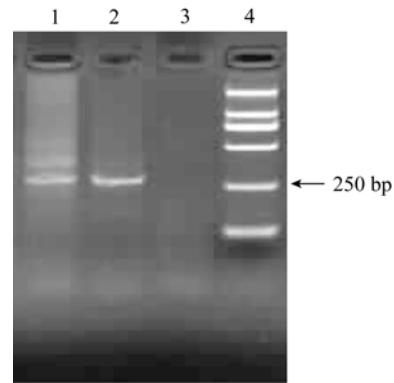


图 8 转化藻株的 PCR 鉴定

Fig. 8 PCR identification of transformed algal strains. 1: pMDDGN-Bar; 2: G5Glut1-Bar; 3: wild-type *D. salina*; 4: D2000 marker.

3 讨论

操纵微藻代谢途径其目的是希望获得有价值的目的产品或行使特殊的代谢途径(图 10)。目前操纵微藻的代谢调控途径主要有 2 种^[2], 其一是迫使微藻利用特异的环境因子, 如培养基条件的改变; 其二通过诱变或引入外源基因直接改变其代谢调控途径。本研究就是通过引入外源基因葡萄糖转运基因 *Glut1* 改变杜氏盐藻的代谢调控途径, 即从光合自养型转变为异养型。

一些微藻有能力代谢糖而异养生长, 如小球藻^[3], 此外, 单细胞小球藻 *Chlorella kessleri* 在 D-葡萄糖或其他单糖存在的条件下, 其代谢方式可以从自养型向异养型转变^[4], 而另外一些则仅依靠光合作用来完成其代谢调控途径。因为它们缺乏糖和氨基酸的转运系统, 不能利用外源的有机碳源, 如盐藻、硅藻等。 *Volvox carteri* 是第一个通过转入 *HUP1* 基因而实现异养生长的绿藻^[5]。相似营养模式的转化已经在莱茵衣藻^[6]和硅藻^[7]中实现, 这其中每一个从自养型向异养型转变都是通过引入单个基因而实现的。在此基础上, 作者通过克隆葡萄糖转运基因 *Glut1*, 并分别构建驱动 *Glut1* 基因表达的盐

```

> ref |NM006516.1 |G| Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter),
member 1 (SLC2A1), mRNA
Length=2856
Score = 490 bits (265), Expect = 3e-136
Identities = 265/265 (100%), Gaps = 0/262 (%)
Strand = Plus/Plus

Query 1   AGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTACCCACAGCCTTTCGTGGGGCCCTGGG 60
Sbjct 590  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| 649
           AGGCTTCGTGCCCATGTATGTGGGTGAAGTGTACCCACAGCCTTTCGTGGGGCCCTGGG

Query 61   CACCCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCCGGCCTGGA 120
Sbjct 650  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| 709
           CACCCCTGCACCAGCTGGGCATCGTCGTCGGCATCCTCATCGCCCAGGTGTTCCGGCCTGGA

Query 121  CTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGC 180
Sbjct 710  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| 769
           CTCCATCATGGGCAACAAGGACCTGTGGCCCTGCTGCTGAGCATCATCTTCATCCCGGC

Query 181  CCTGCTGCAAGTGCATCGTCTGCCCTTCTGCCCGGAGAGTCCCGCTTCCTGCTCATCAA 240
Sbjct 770  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| 829
           CCTGCTGCAAGTGCATCGTCTGCCCTTCTGCCCGGAGAGTCCCGCTTCCTGCTCATCAA

Query 241  CCGCAACGAGGAGAACCGGGCCAAG 265
Sbjct 830  ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| 854
           CCGCAACGAGGAGAACCGGGCCAAG
  
```

图 9 转化藻株中 *Glut1* 基因的 Blast 分析
 Fig. 9 Blast analysis of *Glut1* gene in transformed algal strains.

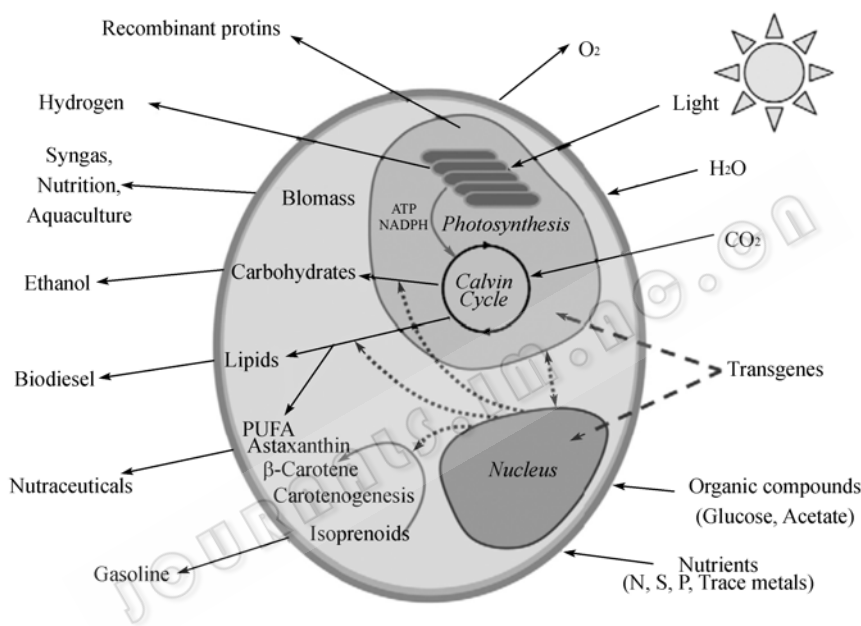


图 10 藻类商业上重要的代谢途径^[2]
 Fig. 10 Commercially important metabolic pathways in microalgae^[2].

藻诱导型和组成型表达载体，这是实现盐藻营养模式转变的首要条件，也是极其关键的因素之一。在表达载体的构建过程中，需要选择合适的启动子和终止子。本试验利用已经克隆的盐藻 DCA 启动子和 *Nos* 终止子，分别构建含 Bar 盒的盐藻表达载体 pMDDGN-Bar 和 G5*Glut1*-Bar(其上含有双增强子的 CaMV35S 启动子和来自烟草花叶病毒 RNA 5'端非翻译序列，即Ω序列，是翻译水平上增强蛋白质表达的调控元件，它在真核和原核系统中有明显增强作用)，以期使盐藻进行异养，探讨 *Glut1* 基因的表达及在盐藻中的功能。

此外，利用本实验室优化的电击转化的方法(待

发表)，将所构建的高效表达载体转化盐藻，并且在盐藻中得到了稳定表达，筛选出了稳定转化株，并通过 PCR 方法证实转化藻株中已稳定表达 *Glut1* 基因，表明 *Glut1* 基因确已整合到盐藻的基因组中，表明构建的表达载体可用于盐藻中 *Glut1* 基因的表达。在后续的工作中，尚需要进一步检测稳定转化藻株的最佳葡萄糖的利用能力，并能在后续的鉴定工作中比较 2 种类型启动子驱动表达的异同及通过不同的盐浓度筛选诱导型启动子的最佳诱导条件。盐藻异养转化藻株的成功建立为进一步的盐藻大规模培养打下基础，为盐藻生物反应器表达外源基因提供了良好的技术平台。

REFERENCES

- [1] Apt KE, Behrens PW. Commercial developments in microalgal biotechnology (Review). *J Phycol*, 1999, **35** (2): 215–226.
- [2] Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, *et al.* A green light for engineered algae: Redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, **19** (5): 430–436.
- [3] Xu H, Miao XL, Wu QY. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol*, 2006, **126** (4): 499–507.
- [4] Komor E, Tanner W. Characterization of the active hexose transport system of *Chlorella vulgaris*. *Biochim Biophys Acta*, 1971, **241** (1): 170–179.
- [5] Hallmann A, Sumper M. The *Chlorella* hexose/H⁺ symporter is a useful selectable marker and biochemical reagent when expressed in *Volvox*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (2): 669–673.
- [6] Doebbe A, Rupprecht J, Beckmann J, *et al.* Functional integration of the *HUP1* hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological H₂ production. *J Biotechnol*, 2007, **131** (1): 27–33.
- [7] Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Shih C, *et al.* Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, 2001, **292** (5524): 2073–2075.

《生物工程学报》“代谢工程和细胞工厂”专刊征稿通知

代谢工程自 1991 年诞生以来,倍受科研工作者的关注,成为研究热点。随着生物技术的发展,代谢工程作为一门改善细胞性能的新兴学科,在植物、动物、微生物乃至人体组织细胞的基因治疗及代谢分析方面得到了广泛的应用,发挥了重要的作用。为了展现代谢工程科研工作者取得的最新进展,促进我国代谢工程的进步和发展,本刊拟于 2009 年 9 月出版一期主题为“代谢工程和细胞工厂”的专刊。

为缩短审稿时间、加快专刊稿件的出版速度,本刊将专门组织 6~10 人的专家评委会,严格按照《生物工程学报》评审要求对稿件进行认真评审。对所收稿件进行快速处理,最终择优筛选出一定数量的稿件以专刊出版,具体安排如下:

一、征文范围

本专刊收录代谢工程领域所取得的最新研究成果和技术成果,包括研究论文和综述,但不限于此:

1 基因组学和基因组尺度的代谢网络模型; 2 代谢组学和代谢控制分析; 3 生物转运系统; 4 代谢途径工程; 5 进化代谢工程; 6 系统生物技术和反向代谢工程; 7 代谢工程方法学; 8 用于代谢工程的遗传工具。

二、投稿要求

1. 投稿方式:通过《生物工程学报》投稿系统在线投稿,详见主页(<http://journals.im.ac.cn/cjbcn/ch/index.aspx>)投稿须知/投稿方式。

注意事项:投稿时,请在稿件标题栏注明“代谢工程和细胞工厂专刊”字样,否则将以普通稿件进行处理。

2. 稿件格式:参照《生物工程学报》论文格式,详见主页/投稿须知/书写要求。

3. 投稿文章应未在正式出版物上发表过,也不在其他刊物或会议的审稿过程中,不存在一稿多投现象;应保证投稿文章的合法性(无抄袭、剽窃、侵权等不良行为)。

三、本专刊几个关键的时间:

1. 收稿截止日期:2009 年 4 月 30 日

2. 决定是否录用日期:2009 年 6 月 10 日

3. 录用后作者修回截止日期:2009 年 6 月 30 日

4. 出版日期:2009 年 9 月 25 日

四、特别说明:

1. 本专刊不是增刊,而是在 2009 年第 9 期《生物工程学报》正刊上刊出。

2. 由主编邀请的专刊投稿文章免收审理费;录用后正式刊发的文章将请作者提交版权转让协议,并按照《生物工程学报》相关规定收取版面费和支付作者稿酬,同时赠送样刊及单行本。

五、联系方式:

电话:010-64807509; 传真:010-64807327; E-mail: cjb@im.ac.cn

邮寄地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物研究所 B401 (邮编:100101)

欢迎您的来稿!

《生物工程学报》编辑部

2009-2-9