

杜氏盐藻 *psaB* 基因 cDNA 的克隆与序列分析

Cloning and Analysis of *psaB* cDNA of *Dunaliella salina*

刘红涛, 臧卫东, 鲁照明, 王宁, 侯桂琴, 李慎柯, 薛乐勋*

LIU Hong-Tao, ZANG Wei-Dong, LU Zhao-Ming, WANG Ning, HOU Gui-Qin, LI Shen-Ke and XUE Le-Xun*

郑州大学细胞生物研究室, 郑州 450052

Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

摘要 根据真核生物莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、*Chlamydomonas moewusii*、*Chlorella vulgaris* 以及 *Mesostigma viride* 的 *psaB* 基因的氨基酸高度保守序列, 设计一对简并引物, 利用 TRIzol 试剂提取杜氏盐藻(*Dunaliella salina*) 细胞的总 RNA, 通过 RT-PCR 得到的一段长为 1.8kb 左右的 cDNA 片段。PCR 产物经 T-A 克隆并测序分析以及测序结果推导成氨基酸序列进行同源性比较, 表明所克隆的 1815bp 序列为杜氏盐藻 *psaB* cDNA 片段, GenBank 收录号为 AY820754。根据已经得到的 *psaB* 序列推导成氨基酸序列与一些已知物种的 *psaB* 基因相比较, 同源性分别为 *Chlamydomonas reinhardtii* 92%, *Chlamydomonas moewusii* 91%, *Chlorella vulgaris* 86%, *Mesostigma viride* 85%, *Physcomitrella patens* subsp. *Patens* 85%, *Nephroselmis olivacea* 84%。据此可推断本实验中所克隆的序列为杜氏盐藻 *psaB* cDNA 序列。

关键词 杜氏盐藻, A2 亚基, *psaB*, cDNA, 简并引物

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0642-04

Abstract One pair of degenerate primer was designed according to conserved motifs of the *psaB* (A2 subunit of photosystem I) of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *Chlorella vulgaris* and *Mesostigma viride*, and a total RNA of *Dunaliella salina* (*D. salina*) was extracted with TRIzol reagent. A cDNA fragment, about 1.8kb in length, from green algal *D. salina* was obtained through RT-PCR method. The resulting PCR product was cloned into T-vector and screened to determine its sequence. Homologous analysis of the deduced amino acid sequence was performed by BLAST and subsequently compared with GenBank data. The obtained cDNA sequence was 1815 bp long, which encodes 605 amino acids (GenBank accession number: AY820754). The sequence shared high homologue with the following *psaB*: *Chlamydomonas reinhardtii* 92%, *Chlamydomonas moewusii* 91%, *Chlorella vulgaris* 86%, *Mesostigma viride* 85%, *Physcomitrella patens* subsp. *Patens* 85% and *Nephroselmis olivacea* 84%. It can be concluded that the cloned sequence is *psaB* cDNA fragment from *D. salina*.

Key words *Dunaliella salina*, A2 subunit, *psaB*, cDNA, degenerate primer

光系统 I (photosystem I, PS I) 反应中心是质体蓝素-铁氧化还原蛋白的氧化还原酶系统^[1], 它由两个主要的蛋白 *psaA* 和 *psaB* 组成^[2]。高等植物的叶绿体由 PS I 和光系统 II

(photosystem II, PS II) 组成, PS I 由大约 13 个单独的多肽所组成, 它们与反应中心的 P700、电子受体 A_0 、 A_1 、铁硫中心以及光捕获叶绿素色素相结合^[3,4], 一齐构成 PS I 稳定的电子传

Received: December 30, 2004; Accepted: March 30, 2005.

This work was supported by the grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30270031, 30300208), and Henan Innovation Scholar Project for Medical Science and Technology (2001006).

* Corresponding author. Tel: 86-371-66658332; E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30270031, 30300208)和河南省医学科技创新人才工程项目(No.2001006)编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

递链。另外, Nishiyama 和 Kato 对五种叶绿体基因进行进化分析时, 发现 *psaB* 基因在进化分析中效果最佳^[5], 质体基因 *psaA*、*psaB* 以及 *rps14* 编码 PS I 反应中心的叶绿素蛋白 A1, A2 和核糖体蛋白 CS14, 它们在环状的质体基因组中共同组成一个类似原核生物的操纵子, 前面共同由一个启动子来调控其表达^[6]。

杜氏盐藻是一种抗逆性很强的单细胞真核绿藻, 能在 0.05 ~ 5 mol/L 的盐水中生长、繁殖^[7]。杜氏盐藻的突出优点在于培养条件简单, 光合自养, 抗逆性极佳, 这些特性为利用其进行实验提供了便利。本研究通过比较现有已知物种的 *psaB* 基因的氨基酸序列, 利用 *psaB* 基因的氨基酸高度保守序列设计一对简并引物, 通过 RT-PCR 从杜氏盐藻中克隆出 *psaB* cDNA 片段。该研究为进一步克隆 *psaA-psaB-rps14* 操纵子打下基础, 为利用该启动子在转基因盐藻的研究中的应用起到十分重要的作用, 而且还有利于阐明杜氏盐藻生长过程中叶绿体转录调控及其光合作用的机理, 同时可以通过 *psaB* 基因的进化分析更加深刻地了解杜氏盐藻与其他高等植物以及真核藻类之间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻株和菌株: 杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*, UTEX 1644 Teod) 购自美国德州大学 (The University of Texas, USA), 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司; AMV first strand cDNA synthesis kit 购自上海生物工程公司; 限制酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 pMD18-T 载体均购自生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa); 凝胶回收试剂盒和质粒 DNA 提取试剂盒购自杭州维特洁公司。

1.2 方法

1.2.1 杜氏盐藻细胞的培养: 按照 5×10^5 细胞/mL 的接种量接种于 PKS 液体培养基^[8], 于 27°C 光照条件下培养, 光照强度为 4500 Lux, 明暗周期为 12h:12h。

1.2.2 杜氏盐藻总 RNA 的提取: 取接种 4 d 左右的杜氏盐藻细胞, 计数, 调整至大约 1×10^6 细胞/mL, 取 1 mL, 用 TRIzol 试剂提取杜氏盐藻细胞的总 RNA。首先 4°C 4000g, 4min 离心收集杜氏盐藻细胞, 弃去上清, 加入 1 mL TRIzol 试剂, 混合均匀, 室温静置 5min; 加入 20% TRIzol 量的氯仿 200 μ L, 用力混合均匀, 室温静置 3min; 于 4°C 12000g 离心 15min, 吸取上清加入 20% TRIzol 量的异丙醇 500 μ L, 混合均匀, 室温静置 10min; 在 4°C 条件下, 12000g 离心 15min; 弃上清, 沉淀用 DEPC (焦磷酸二乙脂) 配制的 75% 的乙醇清洗 1 遍, 7500g 5min 4°C 离心, 室温干燥沉淀, 最后用适量 DEPC 配制的无菌水溶解 RNA。通过变性凝胶电泳和测定 OD_{260} 的值, 判断提取的总 RNA 的质量。

1.2.3 简并引物的设计: 从 GenBank 上搜索莱茵衣藻、*Chlamydomonas moewusii*、*Chlorella vulgaris* 以及 *Mesostigma viride* 的 photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A2 亚基 (*psaB*)

基因的氨基酸序列进行比对, 找出两段保守的序列: AWQGNFE 和 RGYWQE。然后按照对应的密码子翻译成核苷酸序列, 涉及密码子简并性的分别用 N、R、Y 及 X 代替, 由此设计的简并引物为:

上游引物 5'GGN TGG CAR GGN AAY TTY GAR 3'

下游引物 5'YTC YTG CCA RTA NCC NCX 3'

其中 Y = C/T, R = G/A, X = G/T, N = A/T/C/G, 上述引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2.4 RT-PCR 扩增杜氏盐藻 *psaB* 基因的 cDNA 片段: 以提取的杜氏盐藻总 RNA 为模板, 根据 AMV first strand cDNA synthesis kit 的说明, 用 AMV 反转录酶合成 cDNA 第一链, 以此为模板, 用合成的简并引物, 进行 RT-PCR 扩增 *psaB* 基因 cDNA 片段。反应体系如下: $10 \times$ PCR buffer 5 μ L, 引物各 1 μ L (50 μ mol/ μ L), Taq 酶 0.5 μ L (5u/ μ L), dNTP 4 μ L (10 mol/ μ L), 模板 cDNA 1 μ L, H₂O 37.5 μ L, 总反应体积 50 μ L。反应程序为 95°C 预变性 1min, 然后按下列循环参数进行扩增反应: 94°C 30s, 50°C 30s, 72°C 90s, 经 30 个循环后, 72°C 10min, 以确保新生链延伸完全。反应结束后, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.5 杜氏盐藻 *psaB* 基因 cDNA 片段的测序分析和序列比对: 用凝胶回收试剂盒回收目的 RT-PCR 产物, 利用 T-A 克隆方法亚克隆到 pMD18-T 载体 (全长 2.69kb) 上, 转化感受态大肠杆菌 JM109, 用含 Amp, X-gal 和 IPTG 的 LB 平板进行筛选, 挑取阳性菌落提取质粒 DNA, 用 pMD18-T 载体上的多克隆位点两侧的 EcoR I 和 Sal I 进行双酶切鉴定。感受态细菌的制备、连接、质粒 DNA 的提取、DNA 的酶切鉴定等, 参见分子克隆实验技术^[9]。含有目的插入片段的阳性菌落交由大连宝生物工程有限公司测序。测序结果与 GenBank 上其他物种的 *psaB* 基因序列进行序列比对, 用 BLAST 进行同源性分析。

2 结果和讨论

2.1 杜氏盐藻 RNA 纯度及质量鉴定

由图 1 可以看出, Trizol 试剂提出的杜氏盐藻总 RNA, 在电泳条件下未发现有基因组 DNA 和蛋白质的污染, 28S 核糖体 RNA 与 18S 核糖体 RNA 的带型比较清晰, 无拖尾现象, 两条带的亮度比基本上呈 2:1 的关系, 由此说明提出的 RNA 完整性比较好。为了进一步确定此 RNA 的质量, 还对其进行了 220nm ~ 300nm 波长的紫外光扫描 (表 1), 其 OD 值为 260/230 > 2.00, 260/280 在 1.90 ~ 2.00 之间, 表明 RNA 的纯度很高, 不存在蛋白质、多糖和酚类的污染, 适合进行下面的 RT-PCR 实验。

表 1 总 RNA 紫外分析结果
Table 1 Results of ultraviolet absorbency of total RNA

OD_{230}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	OD_{260}/OD_{280}
0.601	1.287	0.657	2.141	1.959



图1 总 RNA 电泳

Fig.1 Electrophoresis of total RNA

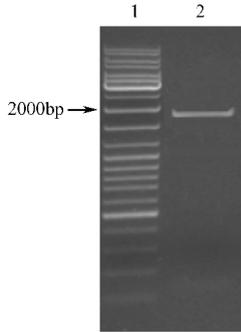


图2 RT-PCR 扩增杜氏盐藻 *psaB* cDNA 序列的电泳结果

Fig. 2 Agarose electrophoresis of RT-PCR product of *D. salina* *psaB* cDNA

1 : molecular size marker : Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix ; 2 : cDNA fragment amplified by RT-PCR.

2.2 RT-PCR 扩增杜氏盐藻 *psaB* 基因的 cDNA 片段

以上述的总 RNA 为模板 通过 RT-PCR 扩增后 琼脂糖凝胶电泳检测在约 1.8kb 处有一明显亮带 与预期目的片段大小一致(图 2)。

2.3 杜氏盐藻 *psaB* 基因推导的氨基酸序列的同源性分析

随机挑取数个阳性克隆进行酶切鉴定 含有正确插入片段(约 1.8kb)(图 2)的质粒进行测序分析。此 cDNA 片段核苷酸序列长为 1815 个碱基(GenBank 收录号为 AY820754) 其推导的氨基酸序列包含 605 个氨基酸残基 所得片段长度与理论值相符。氨基酸序列比对分析表明(图 3) 杜氏盐藻与下列物种的同源性依次为 : *Chlamydomonas reinhardtii* 92% , *Chlamydomonas moewusii* 91% , *Chlorella vulgaris* 86% , *Mesostigma viride* 85% , *Physcomitrella patens* subsp. *Patens* 85% , *Nephrolepis olivacea* 84% 。

3 讨论

杜氏盐藻是一种极其耐盐的特殊逆境生物 但目前对它的遗传背景知之甚少 而且没有基因组文库用来筛选功能基因。简并引物是一类由多种寡核苷酸组成的混合物 彼此之

```

D. s AWQGNFEQWVTDP IIVRP IAHAIWDP IIFGQPAVEAFTRGGASGPVNIATSGVYQWWT IGLRSKQELYVGSVFLALISAVFLFAGWLIJLQPNFQPSLWFKDAESRL
C. r AWQGNFEQWVTDPVH I RPIAHA I WDPHFQPAVEAFTRGGASGPVNIATSGVYQWWT IGMRTNQDLIYVGSVFLALVSAIFLFLAGWLIHQPNFQPSLWFKDAESRL
C. m AWQGNFEQWVTDPVHVRP IAHAIWDP IIFGTSAVEAFTRGGASGPVNIATSGVYQWWT IGMRTNQDLFTGVSFLALVSAVFLFAGWLIJLQPNFQPSLWFKDAESRL
C. v AWQGNFEQWVQDPLI IIRP IAHAIWDP IIFGQA AVEAFTRGGASGPVNIATSGVYQWWT IGI RTNQELYVGSIFLLVLVLAGLFLFAGWLIJLQPSFPALSWFKNAESRL
M. v AWQGNFERVWADPLI IIVRP IAHAIWDP IIFGQPAVEAFTRGGASGPVNIATSGVYQWWT IGMRSNTDLYIGALFLLITASMTLFLFAGWLIJLQPNFQPSLWFKNAESRL

D. s NHHLSGLFGVSSLAWTGHLVHVAIPESRQGHVGDNFLSVLPIHPQGLAPFWSGNWAAAYQNPDASHAFGTADGSGTA I LTFLLGGFHPQTQSLWLTDMAHHHI IAI V
C. r NHHLSGLFGVSSLAWTGHLVHVAIPESRQGHVGDNFLSVLPIHPQGLTPFFFTGNWAAAYAQSPDASHVFGTAQSGGQA I LTFLLGGFHPQTQSLWLTDMAHHHI IAI V
C. m NHHLSGLFGVSSLAWTGHLVHVAIPESRQGHVGDNFLSVLPIHPQGLAPFWSGNWAAAYQNPDASHAFGTSECSGQA I LTFLLGGFHPQTQSLWLTDMAHHHI IAI V
C. v NHHLAGLFGVSSLAWTGHLVHVAIPESRQGHVGDNFLT V LPHPAGLTPFFFTGNWAAAYENPDSLQLFGTGGSGTA I LTFLLGGFHPQTQSLWLTDMAHHHI IAI V
M. v NHHLSGLFGVSSLAWTGHLVHVAIPESRQGHVVRWDFNLV LPHPAGLSPFFFTGNWAAAYQNPDSTSH I FSTSQGAGTA I LTFLLGGFHPQTQSLWLTDAIHHH IAI V

D. s LFI VAGHYMRTNFG I GHRLEA I LEAHTPPAGGLGTGHKGLFHITVNSLIHFQLGLALASVGTITSLVAQIMYSLPPYAYLAVDFTTQASLYTHIIQYIAGFIMCGAFAI
C. r IFI VAGHYMRTNFG I GHRMQA I LEAHTPPSGSLGAGIKGLFDTVNSLIHFQLGLALASVGTITSLVAQIMYSLPPYAFQAI DFTTQAALYTHIIQYIAGFIMCGAFAI
C. m IFI VAGHYMRTNFG I GHRQLA I LDAIIVPPSGNLGAGIKGLFDTVNSLIHFQLGLALASVGTITSMIAQI IYSLPPYAYLAIDFTTQAALYTHIIQYIAGFIMCGAFAI
C. v VFLIAGHYMRTNFG I GHSMRI I LEAQTTPSGRLGAGIKGLYDVTNNSLIHFQLGLALASVGTICSLVAQIMYSLPPYAFLAQDFTTQASLYTHIIQYIAGFIMCGAFAI
M. v LFI VAGHYMRTNFG I GHSMRI I LEAQRPPGRLGAGHSGLYDVTNNSLHFQLGLALASLGVITSVVAQHMYSLSPYAFLAQDFTTQAALYTHIIQYIAGFIMCGAFAI

D. s GA I FF I RDYDPEQNKGNVLR I LARTLDHKEA I I SHLSVWSLFLGFHTLGLYVHNDVVMQAFGTPEKQ I L I EPVFAQW I QAAQKSLYGFDFLSSSSSAAAFANGQSLWLP
C. r GA I FF I RDYDPEQNKGNVLR I LARTLDHKEA I I SHLSVWSLFLGFHTLGLYVHNDVVMQAFGTPEKQ I L I EPVFAQW I QAAHGKALYGFDFLSSKTSAAAFANGQSLWLP
C. m GA I FF I RDYDPEANKNVLR I LDHKEA I I SHLSVWVTLFLGFHTLGLYVHNDVVMQAFGTPEKQ I L I EPVFAQW I QAAQKTVYGFDFLSSSTSVASTAGQSVWLP
C. v GA I FFV RDYDPEANRGNVLR I LARTLDHKEA I I SHLSVWSLFLGFHTLGLYVHNDVVMQAFGTPEKQ I L I EPVFAQW I QAAHGKTVYGFDFLSSATSAPSLAGQSLWLP
M. v GA I FF I RDYDPELNKDNVLR I LARMLDHEA I I SHLSWASLFLGFHTLGLYVHNDVVMQAFGTPEKQ I L I EPVFAQW I QASIGKSLYGFDFLSSSSSFAASASDSIWLPG

D. s WLEA I NNNQNSLFLT I GPGDFLVHHA I A I GLHITTTL I L VKGALDARGSKLMPDKKDFGYSFPCDGPGRGGTCD I SAYDAFYLA VFWLNT I GWVTFYFHWKHLALWQ
C. r WLD A I NNNQNSLFLT I GPGDFLVHHA I A I GLIHTTTL I L VKGALDARGSKLMPDKKDFGYSFPCDGPGRGGTCD I SAYDAFYLA VFWLNT I GWVTFYFHWKHLALWQ
C. m WLD A I NNNQNTLFLT I GPGDFLVHHA I A I GLHITTTL I L VKGALDARGSKLMPDKKDFGYSFPCDGPGRGGTCD I SAYDAFYLA VFWLNT I GWVTFYFHWKHLALWQ
C. v W L Q G I NSDTNSLFLT I GPGDFLVHHA I A I GLIHTTTL I L VKGALDARGSKLMPDKKDFGYSFPCDGPGRGGTCD I SA WDAFYLA VFWLNT I GWVTFYFHWKHLALWQ
M. v WLD A I NSNSLFLT I GPGDFLVHHA I A I GLIHTTTL I L VKGALDARGSKLMPDKKDFGYSFPCDGPGRGGTCD I SA WDAFYLA VFWLNT I GWVTFYFHWKHLALWQ

D. s GNAQFDESSTYL MGWLRDYLWLNSSQLINGYNPFGMNSLSVWAWTFLFGHLIYATGFMF L I SWRGYWQE
C. r GNAQFDESSTYL MGWLRDYLWLNSSQLINGYNPFGMNSLSVWAWTFLFGHLIYATGFMF L I SWRGYWQE
C. m GNAQFDESSTYL MGWLRDYLWLNSSQLINGYNPFGMNSLSVWAFCLFGHLIYATGFMF L I SWRGYWQE
C. v GNVQFNESSTYL MGWLRDYLWLNSSQLINGYNPFGMNSLSVWAWMFLFGHLIYATGFMF L I SWRGYWQE
M. v GNAQFDESSTYL MGWLRDYLWLNSSQLINGYNPFGMNSLSVWAWMFLFGHLIYATGFMF L I SWRGYWQE

```

图3 *psaB* 基因推导氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequences of *psaB*

D. s : *Dunaliella salina* ; C. r : *Chlamydomonas reinhardtii* ; C. m : *Chlamydomonas moewusii* ; C. v : *Chlorella vulgaris* ; M. v : *Mesostigma viride*

间有一个或数个核苷酸的差异。通过简并引物进行 PCR, 可以相对简便地检测一个已知基因家族的新成员, 或用来检测物种间的同源基因^[10]。通过比较物种间氨基酸保守序列设计简并引物, 用 PCR 的方法筛选同类基因, 不失为一种简单可靠的方法^[11]。

作者根据 GenBank 上登录的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、*Chlamydomonas moewusii*、*Chlorella vulgaris* 以及 *Mesostigma viride* 等真核生物的 *psaB* 基因的氨基酸序列, 比较筛选出高度保守、并且核苷酸简并程度较低的区域 AWQGNFE 和 RGYWQE, 设计简并引物, 进行 RT-PCR, 以获得杜氏盐藻的 *psaB* 基因信息。根据 BLAST 分析结果, 本实验所得的核苷酸序列转化成氨基酸序列后, 与 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *Chlorella vulgaris*, *Mesostigma viride*, *Physcomitrella patens* subsp. *Patens*, *Nephroselmis olivacea* 的 *psaB* 基因氨基酸序列的同源性分别为 92%、91%、86%、85%、85% 和 84%, 从而推断该片段为杜氏盐藻的 *psaB* cDNA 片段。

在高等植物中, 有关 *psaB* 基因研究多集中在它与上游的 *psaA* 基因以及下游的 *rps14* 基因共同形成操纵子, 即 *psaA-psaB-rps14* 特殊的操纵子^[6]。该操纵子的启动子(位于 *psaA* 基因上游)具有很强的活性。作者将通过克隆 *psaB* 基因所得的序列信息, 通过 5'-RACE 以及基因组步行文库 (Genome walking) 来进一步克隆得到 *psaA* 及其上游序列, 为利用该启动子在转基因盐藻生物反应器中的应用打下基础(待发表), 同时可以更好地研究杜氏盐藻光合作用的机理与其生长习性之间的关系。

Nishiyama 和 Kato 对五种叶绿体基因进行进化分析时, 发现 *psaB* 基因在进化分析中效果最佳^[5], 也就是说作者可以根据 *psaB* 序列的信息, 来分析杜氏盐藻与其他藻类和高等植物的亲缘关系(待发表)。本实验得到的杜氏盐藻 *psaB* cDNA 片段, 其长度达 1815bp, 接近全长 2.2kb, 基本包括该基因的全部信息, 这对于进一步了解杜氏盐藻与其他植物间的亲缘关系起到了十分重要的作用, 最终可以通过其亲缘关系较近的物种来更进一步弄清杜氏盐藻的遗传背景。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Heathcote P. Type I photosynthetic reaction centres. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1507**(1-3): 1-2
- [2] Fish LE, Kuck U, Bogorad L. Two partially homologous adjacent light-inducible maize chloroplast genes encoding polypeptides of the P700 chlorophyll a-protein complex of photosystem I. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 1413-1421
- [3] Malkin R. Photosystem I. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, **33**: 455-479
- [4] Parrett KG, Mehari T, Warren PG *et al*. Purification and properties of the intact P700 and Fx containing photosystem I core protein. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **973**: 324-332
- [5] Nishiyama T, Kato M. Molecular phylogenetic analysis among bryophytes and tracheophytes based on combined data of plastid coded genes and the 18S rRNA gene. *Mol Biol Evol*, 1999, **16**: 1027-1036
- [6] Wu Sang-Pin, Cheng Ming-Chih, Chen Shu-Chen Grace. Characterization of a spinach chloroplast sequence-specific DNA-binding factor for photosystem I *psaA* operon promoter. *Physiologia Plantarum*, 1999, **106**: 98
- [7] Avron M, Ben-Amotz A. *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry and Biotechnology. CRV Press, Florida, 1992, pp.150
- [8] Fisher M, Pick U, Zamir A. A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. *Plant Physiol*, 1994, **106**: 1359-1365
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] Fietto JL, de Marco R, Verjovsk-Almeida S. Use of degenerate primers and touchdown PCR for construction of cDNA libraries. *Biotechniques*, 2002, **32**: 1404-1408
- [11] Jiang GZ(姜国忠), Niu XL(牛向丽), Li YM(吕玉民) *et al*. Cloning and characterization of Hsp70a cDNA fragment of *Dunaliella salina*. *Hereditas(遗传)*, 2003, **25**(5): 573-576

本刊加入《中国学术期刊(光盘版)》声明

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库, 请在来稿时声明, 本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部