

汪文伦,王丹,牟云,等. 沙漠小球藻转植物表达载体的表达预测[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):41-45.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.009

沙漠小球藻转植物表达载体的表达预测

汪文伦,王丹,牟云,许万云,胡梦薇,高剑峰

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

摘要:以建立小球藻(沙漠小球藻)表达系统为目的,为利用小球藻重组表达外源蛋白,以及 GFP 荧光特性研究沙漠中的小球藻生理及理化性质提供基础方法;同时也探索植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-OCS 能否在沙漠小球藻中表达。通过菌落 PCR 验证 *E. coli* DH5 α 是否含有目的基因(*GFP* 基因)的重组植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS,然后从 *E. coli* DH5 α 中提取也构建完成的重组植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS;利用电转化的方法将重组植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 转入到小球藻细胞中;将电转的小球藻在含有 100 mg/L 卡那霉素的 BBM 固体培养基中筛选出单克隆,将单克隆在含有 15 mg/L 卡那霉素的 BBM 液体培养基中扩大培养,然后利用 PCR 和 RT-PCR 预测绿色荧光蛋白基因(*GFP* 基因)的存在与否和表达情况,再利用 SDS-PAGE 和荧光倒置显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况。通过 SDS-PAGE 和荧光倒置显微镜观察结果表明绿色荧光蛋白(*GFP*)在小球藻中表达成功。试验结果表明重组植物表达 pCAMBIA2300-35S-OCS 能够在小球藻中表达外源蛋白,以及利用 GFP 的荧光特性研究小球藻的生理生化差异;也为小球藻在沙漠环境上的应用提供基础。

关键词:沙漠小球藻;电转化;植物表达载体;绿色荧光蛋白

中图分类号:S917.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)06-0041-04

微藻是地球上出现最早的生命之一,是一种能利用光合作用生活和生长的微生物,广泛分布于海洋、陆地、湖泊以及干旱的沙漠之中。它们的形态各异,呈丝状、球形和椭圆形等等,只要有光和潮湿的地方都能找到这些生命的痕迹^[1]。新疆古尔班通古特沙漠是我国第二大沙漠,年降水量 70~150 mm,冬季有积雪,其最低温度可达 -25℃,而最高温度可达 35℃^[2]。即使在这样的条件下,也分布着百余种藻类,小球藻就是其中之一^[3]。小球藻和其他生长在沙漠里的藻类一样,适应了沙漠的极端环境,表现出较强的生命力。

小球藻是绿藻门的一种,细胞呈球形或椭圆形,细胞的大小在 3~8 μm 之间,也是单细胞藻类植物和真核生物的一种。由于遗传的相对保守性、生长快、分布广、营养要求简单和成本低廉等特点,是在单细胞水平上研究基因表达及其生理生化的理想材料。而基因工程也是研究热点之一,目前的转基因技术有鸟枪法^[4]、根瘤杆菌介导法^[5]和电转化法^[6]。由于电转化法有效率较高、简单、方便、成本低等特点,在微藻遗传转化过程中也被广泛使用。

启动子是外源基因是否表达的关键,这决定着基因表达与否及其表达量,所以在小球藻基因工程的研究中也起着至关重要的作用。目前,CaMV35S 是基因工程中常用的启动子之一。CaMV35S 是一种花椰菜花叶病毒启动子,能够在植物表达系统中启动基因的表达^[7],也有研究表明 CaMV35S 可以

在小球藻表达外源基因^[5,8]。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是由 238 个氨基酸组成的多肽链,分子量约为 27 ku,基因编码序列约 750 bp。纯化的 GFP 蛋白与体内表达的 GFP 蛋白的发光光谱相似,在蓝光或紫外光激发下,无论其表达在原核或真核细胞中,都能利用荧光显微镜在不需要其他辅助条件下看见绿色荧光。绿色荧光蛋白还具有低毒性和不干扰细胞正常生活等优点,使得 GFP 在生物研究领域中得到广泛应用。目前 GFP 已在转基因领域、基因表达的蛋白质定位、细胞定位以及药物的筛选等诸多方面得到广泛应用^[9]。

本试验将利用 GFP 的特点和已经构建好的重组植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS,通过电击转化法导入到细胞中,让其表达绿色荧光。这将为在小球藻中表达外源蛋白和利用 GFP 研究其生理及理化性质提供试验的基本操作和基础;同时也为表达载体 pCAMBIA2300-35S-OCS 在小球藻中的表达做 1 个预测。

1 材料与与方法

1.1 材料

小球藻 GTD8A1 由笔者所在实验室分离、纯化和鉴定得到;植物表达载体 PCAMBIA2300-35S-GFP-OCS(带有 CaMV35S 调控下的 *GFP* 基因)由石河子大学生命科学学院黄先忠老师馈赠;大肠杆菌 DH5 α 菌株为笔者所在实验室保存;卡那霉素(kanamycin, Kan)购自北京索莱宝科技有限公司。

小球藻 GT8A1 所用的 BBM 培养基^[10]:NaNO₃ 250 mg/L, KH₂PO₄ 175 mg/L, K₂HPO₄ 75 mg/L, MgSO₄·7H₂O 75 mg/L, CaCl₂·2H₂O 25 mg/L, NaCl 25 mg/L, EDTA 50 mg/L, KOH 31 mg/L, FeSO₄·7H₂O 4.98 mg/L, H₃PO₄ 11.42 mg/L,

收稿日期:2015-05-07

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2011-CB200900-G)。

作者简介:汪文伦(1988—),男,贵州金沙人,硕士,主要从事可再生

能源的开发与利用相关研究。E-mail:1019159335@qq.com。

通信作者:高剑峰。E-mail:jianfeng@shzu.edu.cn。

ZnSO₄ · 7H₂O 8.82 mg/L, MnCl₂ 1.44 mg/L, MoO₃ 0.71 mg/L, CaSO₄ · 5H₂O 1.57 mg/L, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.49 mg/L, 98% H₂SO₄ 2 μL/L(可以在以上组中加入 15 ~ 20 g 琼脂,加入蒸馏水补至 1 L 制成固体培养基, 121 °C 灭菌 20 min, 4 °C 保存)。

E. coli DH5α 所用的 LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L(加去离子水溶解至终体积 1 L, 用 2 mol/L NaOH 调 pH 值范围为 7.0 ~ 7.4, 同时加入 15 ~ 20 g 琼脂粉, 制成固体培养基; 在 121 °C 高压下灭菌 20 min, 4 °C 保存)。

1.2 方法

1.2.1 藻种培养及其条件

取对数生长末期的小球藻培养液, 按 10% 的接种量接入装有 100 mL BBM 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 置于光照培养箱中静止培养, 培养条件为: 光照强度为 100 μmol/(m² · s), 光暗周期 12 h/12 h, 培养温度 (23 ± 0.5) °C。

转化子克隆的筛选: 将转化好的小球藻 GT8A1 涂布于含有 100 mg/L 卡那霉素^[1] 的 BBM 固体平板上, 4 ~ 5 周会有单克隆长出。然后进行菌落 PCR 检测, 得到阳性克隆。

阳性克隆的扩大培养: 将阳性克隆接入到含有 15 mg/L 卡那霉素的 BBM 液体培养基中, 进行逐级扩大培养。

1.2.2 提取 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 和 GFP 引物设计

GFP 基因引物设计: 从 NCBI 上得到 GFP 蛋白的序列, 通过 Primer 5 软件从头开始设计 *GFP* 基因引物, 使其能完全地表达 GFP 蛋白。引物序列如下: GFP-F: 5' - ATGATGGT-GAGCAAG - 3'; GFP-R: 5' - TGTACAGCTCGTCCATG - 3'。

pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 载体也由黄先忠老师实验室构建完成, 并且成功地在拟南芥中表达^[11]。也将其保存到 *E. coli* DH5α 中, 在做电击转化之前需要将 *E. coli* DH5α 进行菌落 PCR 检测后, 才能进行扩大培养。然后采用质粒提取试剂盒 (TIANGEN Plasmid Kit) 进行提取, 其过程见图 1。

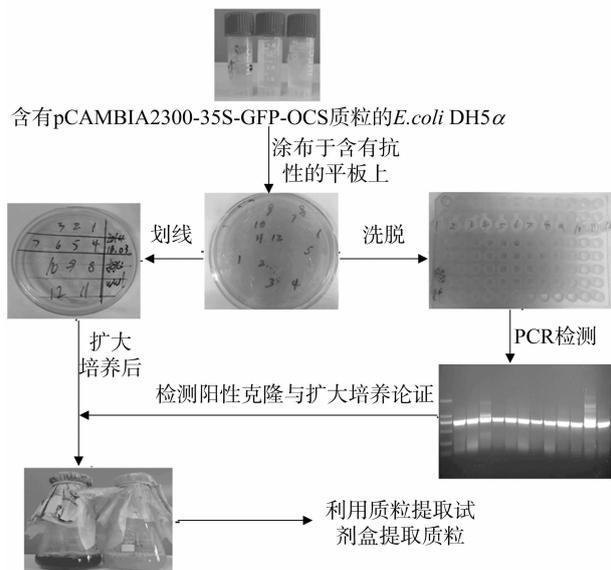


图1 含有质粒pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS的*E. coli* DH5α 扩大培养过程和提取

(GFP-F/GFP-R) 2 μL, 2 × *Taq* PCR MasterMix (TaKaRa, China) 8 μL 共 20 μL 扩增体系, 可以扩增出约 750 bp 的片段。

PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 电击转化法

取培养 4 d 后的小球藻细胞 3 ~ 5 mL (细胞数量控制在 1 × 10⁸ 个/mL), 75 000 g 离心 5 min 收集小球藻细胞后再用无菌的 BBM 培养基清洗 3 次培养基, 然后分别在 5 000, 4 000, 3 000 g 下离心以收集比较干净的小球藻细胞; 将收集好的小球藻细胞置于高渗溶液中 (甘露醇、山梨醇各 100 μL) 在冰上处理约 1 h, 后 3 000 g 离心收集比较干净的小球藻细胞, 去掉上清, 在沉淀中加入 pH 值为 7.2 的 HEPES 电击缓冲液 [取 23.8 g HEPES 溶于 90 mL 双蒸水中, 采用 2 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 7.5 ~ 8.0, 然后用蒸馏水定容至 100 mL, 过滤除菌, 分装小瓶 (2 mL/瓶), 4 °C 保存], 将藻细胞稀释成 1 × 10⁸ 个/mL 放置冰上备用; 用紫外光处理干净的电击杯约 30 min, 将其放置在冰上备用; 按藻细胞: 质粒 = 3 : 1 的比例混匀样本加入到电击杯中, 在冰上放置 10 min 后, 在电击仪上电击, 电击条件为脉冲电压 1 500 V, 持续时间 0.2 s, 脉冲距离 2 mm; 电击后的藻细胞置于含有 3 mL 复活培养基的 6 孔板中, 在黑暗的条件下复活 24 ~ 48 h; 7 000 g 离心 1 min 收集转化小球藻细胞, 再用无菌的 BBM 培养基清洗 3 次, 然后分别 5 000, 4 000, 3 000 g 下离心收集比较干净的小球藻细胞涂布于含有 100 mg/L 卡那霉素的 BBM 固体平板上, 筛选单克隆。培养 4 ~ 6 周后会有单克隆长出, 然后将平板上所长的单克隆用无菌的牙签挑起后置于 10 μL 的 ddH₂O 中, 95 °C 预变性后作为 PCR 反应的模板, 用 PCR 检测阳性克隆。

PCR 反应体系: ddH₂O 8 μL, 单克隆变性液 2 μL, 引物 (GFP-F/GFP-R) 2 μL, 2 × *Taq* PCR MasterMix (TaKaRa, China) 8 μL 共 20 μL 扩增体系, 可以扩增出约 750 bp 的片段。

PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 基因组 DNA 和总 RNA 的提取及目的基因检测

基因组 DNA 的提取: 采用 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN Plant Genomic DNA Kit) 提取, 按照说明书进行提取。

总 RNA 的提取: 采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen USA) 进行提取, 按照说明书进行提取。

总 RNA 采用 TaKaNa 的反转录试剂盒反转成 cDNA 后, 和总 DNA 一样采用 PCR 检测目的基因。

PCR 反应体系: ddH₂O 8 μL, 单克隆变性液 2 μL, 引物 (GFP-F/GFP-R) 2 μL, 2 × *Taq* PCR MasterMix (TaKaRa, China) 8 μL 共 20 μL 扩增体系, 可以扩增出约 750 bp 的片段。

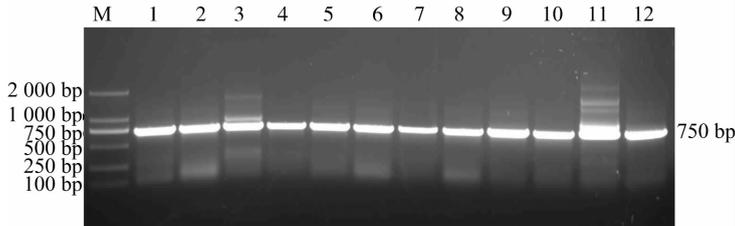
PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 绿色荧光蛋白的 SDS-PAGE 和荧光检测

经过基

PCR 反应体系: ddH₂O 8 μL, 单克隆变性液 2 μL, 引物

因组 DNA 和总 RNA 的检测后。将阳性克隆扩大培养,取 10~15 mL 的培养藻液 75 000 g 离心 2 min 收集转化子的小球藻细胞后,用无菌的 ddH₂O 清洗 3 次,然后利用梯度离心法:分别再 5 000、4 000、3 000 g 离心 5 min 后收集到转化子小球藻细胞,采用蛋白试剂盒提取(Plant Protein Extraction Kit)提取 GFP 蛋白,提取过程按说明书进行。将提取到的蛋白进行 SDS-PAGE 检测;然后采用荧光倒置显微镜(北京斯内克创新科技有限公司)进行荧光检测。操作过程按说明书进行,检测 GFP 蛋白的表达情况。

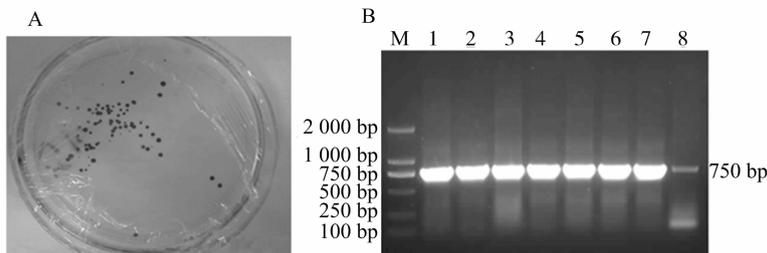


M: DNA标准样; 1~12为单克隆的PCR产物

图2 *E. coli* DH5 α 单克隆检测

2.2 单克隆 PCR 检测

通过涂布筛选得到的单克隆藻细胞,菌落 PCR 检测结果



A. 在含有卡那霉素的固体培养基上筛选含有质粒 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 的单克隆; B. PCR 检测单克隆条带。M—DNA marker 2000; 1~12—沙漠小球藻单克隆。

图3 沙漠小球藻转化子的筛选及单克隆的 PCR 检测

2.3 基因组 DNA 和总 RNA 的提取以及 PCR 鉴定

经过 DNA 提取试剂盒(TIANGEN Plant Genomic DNA Kit)提取的总基因组 DNA,通过 PCR 检测 750 bp 的 GFP 基因片段。总基因组 DNA 检测结果见图 4。结果表明 GFP 基因整合在小球藻基因组中。

经过 TRIzol 试剂(Invitrogen USA)提取总 RNA,结果见图 5-A。然后通过 RT-PCR 反转录出 cDNA 作为模板,通过 PCR 检测 750 bp 的 GFP 基因片段,结果见图 5-B,通过结果预测 GFP 基因整合在小球藻基因组中,同时 GFP 基因也在小球藻细胞中转录成功。

2.4 绿色荧光蛋白的 SDS-PAGE 和荧光检测

通过植物蛋白提取试剂盒对 GFP 蛋白提取后,用 SDS-PAGE 进行检测,结果见图 6。然后将通过梯度离心获得的转化小球藻细胞,在绿色荧光倒置显微镜下观察其表达结果(图 7)。结果表明 GFP 蛋白成功表达于小球藻中。说明植物表达载体 pCAMBIA2300-35S 可以在小球藻中表达外源蛋白,同时也可以做小球藻生理生化的研究载体。

3 讨论

我们都知道绿色荧光蛋白在植物和动物细胞表达成功的

2 结果与分析

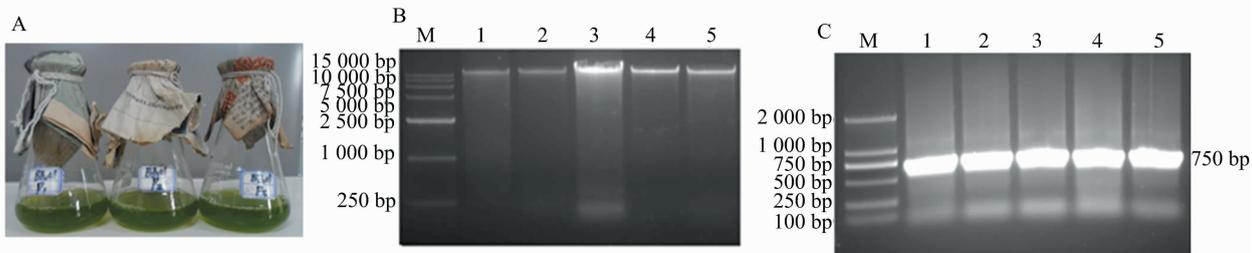
2.1 提取 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 和菌落 PCR 检测

通过菌落 PCR 检测含有 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 载体的 *E. coli* DH5 α 菌株,将含有阳性克隆的重组植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 的 *E. coli* DH5 α 进行扩大培养,提取质粒并用于后续试验,过程和结果见图 1、2。

(图 3)表明,重组质粒载体 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 可能转化进入到小球藻细胞中。

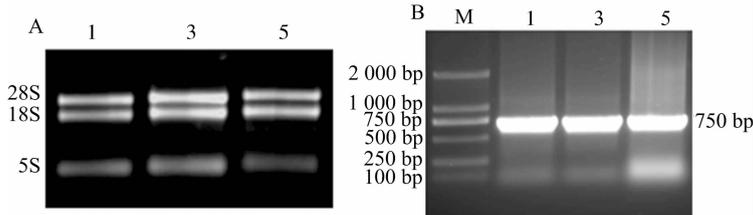
例子不胜枚举,但是在微藻中的研究少之又少。近年,随着微藻优势及其有关基因组基因测序^[12]开发而来,国内外对此的研究也越来越热。从国外的研究进展来看,有研究表明 GFP 蛋白在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)细胞中成功表达^[13-14]。可以看到国外多是以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)作为模式生物来研究外源基因的表达系统;因此,在国内 Jiang 等研究者以小球藻为模式生物来研究其外源基因的表达系统,并且和莱茵衣藻进行了表达的相关比较得知,小球藻表达外源基因系统优于莱茵衣藻^[15]。与此同时,Song 等利用相关的技术和 pAnFP 为表达载体,在鱼腥藻(*Anabaena*)中成功表达了绿色荧光蛋白,并通过荧光倒置显微镜观察到了绿色荧光^[16]。

同样,Guo 等利用相似的转基因技术和 pCAMBIA1302 为载体,在斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)细胞中成功表达了绿色荧光蛋白^[17]。由于 GFP 易于标记和辨认,这使得使用 GFP 来研究表达系统及其生理生化也越来越重要。然而通过上面的讨论,知道不同宿主需要不同的表达载体。提示在进行基因工程的遗传转化研究时,特别是表达一些药用外源蛋白时,进行表达载体的表达筛选也显得尤为重要,这将确定最佳的表达载体以及减少不必要的浪费。



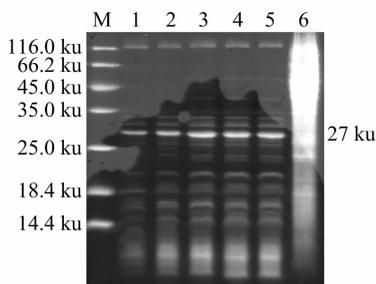
A: 筛选单克隆在有卡那霉素的液体培养基中扩大培养; B: 5株转化藻株的总DNA; M—DNA marker 15000; 1~5—小球藻的转化藻株总DNA。C: PCR分析转化的小球藻的基因组DNA; M—DNA marker 2000; 1~5—小球藻的转化藻株目的条带

图4 基因组 DNA 检测



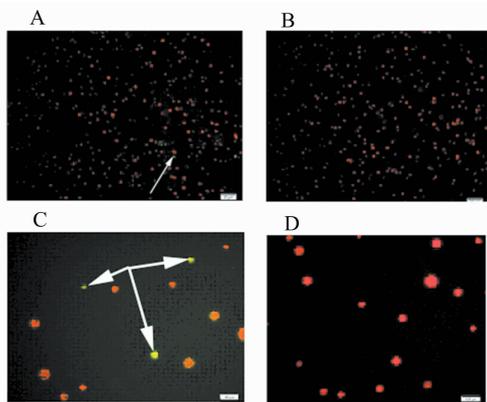
A: 1、3、5转化沙漠小球藻的总RNA; B: 通过RT-PCR and PCR检测GFP基因; M—DNA marker 2000; 1、3—RT-PCR目的基因; 5—PCR目的基因

图5 预测转化沙漠小球藻中的 GFP 基因和转录



M—protein marker; 1~5—试验组; 6—对照组

图6 SDS-PAGE 检测 GFP 蛋白



A、C为实验组; B、D为对照组; 绿色为GFP表达成功, 红色为对照组

图7 GFP 在沙漠小球藻中表达后的荧光倒置显微镜观察图像

目前,有关绿色荧光蛋白(GFP)在小球藻中表达还未见报道。在本研究中,利用电转化的方法将重组植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-GFP-OCS 导入到小球藻中,通过基因组 DNA 和总 RNA 的理论分析和预测,得知绿色荧光蛋白基因可能整合在小球藻基因组中,并且进行了反转录。然后再通过荧光倒置显微镜证实了 GFP 成功地表达于小球藻中,从而验证植物表达载体 pCAMBIA2300-35S 能够用于小球藻中

表达外源蛋白基因,这对于小球藻这种低等植物来说,将来可以利用此载体来研究小球藻的生理生化性质和表达外源蛋白,这也为小球藻利用基因工程商业化和工业化提供基础材料,同时也为沙漠环境上的开发和利用提供基础技术。

参考文献:

[1]朱军保,王丹,汪文伦,等. 4株沙漠小球藻对几种常用抗生素的敏感性研究[J]. 生物技术通讯,2014,25(6):837-841.
 [2]陈钧杰,蒋进,付恒飞,等. 古尔班通古特沙漠腹地土壤水分动态[J]. 干旱区地理,2009,32(4):537-543.
 [3]赵建成,张丙昌,张元明. 新疆古尔班通古特沙漠生物结皮绿藻研究[J]. 干旱区研究,2006,23(2):189-194.
 [4]El-Sheekh M M. Stable transformation of the intact cells of clorella kessleri with high velocity microprojectiles[J]. Biologia Plantarum, 1999,42(2):209-216.
 [5]Chat S, Yee W, Aziz A. Assessment of factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, chlorella vulgaris[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2012,28(4):1771-1779.
 [6]Huang C C, Chen M W, Hsieh J L, et al. Expression of mercuric reductase from Bacillus megaterium MBI in eukaryotic microalga Chlorella sp. DT: an approach for mercury phytoremediation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2006,72(1):197-205.
 [7]Benfey P N, Ren L, Chua N H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development[J]. The EMBO Journal,1990,9(6):1677-1684.
 [8]Wang C H, Wang Y Y, Su Q, et al. Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, Chlorella sp. MACC/C95, via electroporation[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering,2007,12(2):180-183.
 [9]Gambhir S S, Barrio J R, Hershman H R, et al. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression[J]. Nucl Med Bio, 1999,26:481-490.

盖江涛,沈建凯,王 鹏. 主要作物中 PAL 基因家族的鉴定和序列分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):45-49.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.010

主要作物中 PAL 基因家族的鉴定和序列分析

盖江涛,沈建凯,王 鹏

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所,海南儋州 571737)

摘要:苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase [EC:4.3.1.24])存在于各种植物和部分微生物中,是与植物抗病性相关的关键酶,具有重要的植物生理意义。采用 BLASTP 的方法,依托全基因组数据库,获得了拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]、水稻 (*Oryza sativa* L.)、玉米 (*Zea mays* Linn.)、小麦 (*Triticum aestivum* Linn.)、谷子 [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]、大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 6种植物中的 PAL 基因家族共 45 条序列,对其进行了系统进化分析、生物信息学分析等。分析结果显示:单子叶植物与双子叶植物分别聚集在不同的分支,说明单子叶植物水稻、玉米、小麦、谷子亲缘关系较近,双子叶植物拟南芥、大豆亲缘关系较近,而单子叶植物与双子叶植物亲缘关系较远,也说明 PAL 基因的分化在单子叶植物和双子叶植物分化前形成;酸性蛋白质占 93.3%,稳定性蛋白占 97.8%,有信号肽的蛋白占 2.2%,有导肽的蛋白占 4.4%,所有蛋白均为有明显跨膜现象的亲水性蛋白;所有 PAL 基因亚细胞定位于细胞质中,都有蛋白活性位点。分析结果为进一步研究作物中 PAL 代谢机理提供理论支持。

关键词:苯丙氨酸解氨酶;PAL;基因家族;氨基酸

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0045-05

苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC:4.3.1.24) 存在于各种植物和少数微生物中,是目前研究较多的与植物抗病性相关的酶,与植物抗毒素及酚类化合物的形成密切相关^[1-2]。PAL 不能直接抵御病虫害,但在植物体内通过苯丙烷类途径进一步转化为木质素、黄酮、异黄酮、生物碱等次生代谢产物来增强植株的抗性^[3-4]。

1961年,Koukol等首次记录了高等植物中PAL酶的提取分离^[5],此后关于这种酶的研究迅速展开,目前PAL已从水稻^[6]、小麦^[6]等多种植物中得到分离纯化,并对拟南芥^[7]、水

稻^[8]等植物PAL基因进行了cDNA克隆和序列分析。

研究发现,不同种植物中PAL活性不同,如水稻叶的PAL活性远比小麦的高^[6]。在同一株植物中,不同的组织部位PAL活性也不同,一般来说越嫩的部位PAL活性越高^[9],如杨树PAL活性在正在发育的木质部、嫩茎和嫩叶中最高^[10]。免疫细胞化学研究显示PAL合成于栅栏细胞和海绵细胞,主要在细胞质和叶绿体内^[11]。组织印迹显示PAL的mRNA常出现在表皮和微管附近的组织细胞中^[12]。

PAL基因参与复杂的植物防御体系^[13],比如受伤害、病原菌感染及光照(红光、白光等)时,PAL与植物抗性表现出明显的相关性。玉米大斑病^[14]、小斑病^[15]、叶斑病^[16]、小麦赤霉病^[17]、水稻抗UV-B辐射及稻瘟病^[18]、大豆疫霉根腐病^[19]等的研究中都证实感染病原菌的植物PAL活性增强。

在拟南芥中,基因组编码4个PAL基因,分别为PAL1(AT2G37040)、PAL2(AT3G53260)、PAL3(AT5G04230)、PAL4(AT3G10340)。用过量的Cu处理植物显示PAL活性增加,当同时再增加Si的含量时,PAL1、PAL2、PAL3呈现出相

收稿日期:2015-04-21

基金项目:芒果萜类物质合成关键酶基因的鉴定和分析(编号:1630032015026);基因组学研究(编号:0314026);茄科植物中生物碱合成相关基因资源研究(编号:0313219)。

作者简介:盖江涛(1983—),女,山西长治人,硕士研究生,助理研究员,从事植物基因组学研究。E-mail: gji006616@163.com。

通信作者:王 鹏,博士研究生,副研究员,从事植物基因组学研究。E-mail: pwang521@163.com。

[10] 龚春霞,李芳芳,荀亚峰,等. 一株沙漠小球藻不同培养方式的比较[J]. 可再生能源,2013,31(11):106-110,115.

[11] 院海英,吴祥辉,东 锐,等. GFP基因在新疆小拟南芥和拟南芥中的表达分析[J]. 西北植物学报,2012,32(5):881-885.

[12] Misra N, Prasanna kumar panda and bikram kumar parida. Agrigenomics for microalgal biofuel production: an overview of various bioinformatics resources and recent studies to Link OMICS to bioenergy and bioeconomy [J]. OMICS - A Journal of Integrative Biology, 2013, 17(11): 537-549.

[13] Noor - Mohammadi S, Pourmir A, Johannes T W. Method for assembling and expressing multiple genes in the nucleus of microalgae [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36: 561-566.

[14] Rasala B A, Lee P A, Shen Zhouxin, et al. Robust expression and secretion of Xylanase I in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43349.

[15] Jiang Q, Zhao L, Dai J B, et al. Analysis of autophagy genes in microalgae; *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41826.

[16] Song D H, Li J, Hu X X, et al. Construction of a shuttle vector for heterologous gene expression in *Escherichia coli* and *Microalgae anabaena* [J]. Engineering, 2013, 5: 540-544.

[17] Guo S L, Zhao X Q, Tang Y, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system in *scenedesmus obliquus* [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163: 61-68.