

文章编号:1673-1689(2008)05-0027-06

PScgpd1 启动子融合 GUS 基因在 酿酒酵母中的瞬时表达

王俊杰^{1,2}, 饶志明^{*1,2}, 沈微^{1,2}, 方慧英^{1,2}, 诸葛健^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用 PCR 技术从酿酒酵母基因组克隆得到甘油代谢关键酶基因 *gpd1* 启动子, 并成功构建真核生物穿梭表达载体 pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS, 并将其电击转入酿酒酵母中。将构建成功的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 基因工程菌分别在 0.2, 0.5, 1.0 mol/L NaCl 的盐胁迫下培养, 首次通过 GUS 组织化学染色法和荧光法测定 GUS 报告基因的瞬时表达酶活检测 *gpd1* 启动子的酶活表达。研究发现, 酵母甘油代谢关键酶基因 *gpd1* 启动子在不同渗透压下的表达有明显的差异。证实了 *gpd1* 启动子是受渗透压调节的, 属于诱导型启动子, 这可能与渗透压胁迫下的甘油代谢密切相关, 相关研究未见报道。

关键词: 甘油代谢; *gpd1* 启动子; β -葡萄糖苷酸酶

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

Analysis of Promoter *gpd1* of the Key Gene of Glycerol Metabolic in *Saccharomyces cerevisiae* at Different Osmotic Stress

WANG Jun-jie^{1,2}, RAO Zhi-ming^{*1,2}, SHEN Wei^{1,2}, FANG Hui-ying^{1,2}, ZHUGE Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A shuttle vector pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS had been constructed and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. The transformants was cultured in medium with 0.2, 0.5 and 1.0 mol/L NaCl supplement, respectively. The enzyme activity of promoter *gpd1* was determined by transient histochemical analysis of GUS gene at different osmotic pressure. The result showed that the expression of promoter *gpd1* in *S. cerevisiae* at different osmotic pressure were prominently different. It was concluded that the promoter *gpd1* was an inducible promoter, regulated by osmotic pressure.

Key words: glycerol metabolic; promoter *gpd1*; GUS

收稿日期: 2007-07-25.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570142, 20676053); 国家 863 计划项目(2006AA020103); 江苏省青年科技创新人才基金项目(BK2006504); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0532).

作者简介: 王俊杰(1983-), 男, 湖北武汉人, 微生物学硕士研究生.

* 通讯作者: 饶志明(1975-), 男, 江西临川人, 农学博士, 教授, 硕士生导师. 主要从事工业微生物育种及分子生物学改造方面的研究. Email: raozm@yahoo.com.cn

甘油(glycerol)是甘油三酸酯分子的骨架成分;它具有相对分子量小、容易溶解,在生理 pH 值范围内不带净电荷,能被细胞膜保持住,对生物细胞无任何毒副作用等特点,因此被认为是一种极其理想的耐高渗透压介质。在真核生物中,存在于胞浆中的 3-磷酸甘油脱氢酶,以 NAD^+ 为辅酶,催化磷酸二羟丙酮生成 3-磷酸甘油,然后 3-磷酸甘油磷酸酶催化 3-磷酸甘油生成甘油。当环境渗透压升高时,酿酒酵母将合成并在胞内积累甘油以维持细胞内外的渗透压平衡^[1],但是其分子内部作用机理尚未研究清楚。经研究发现^[2-4],3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH)至少有两个同工酶,分别为 *gpd1*、*gpd2*,且生物体内甘油合成代谢中以 *gpd1* 为主;GPDH 作为生物体内甘油合成代谢途径中的限速酶,直接决定了葡萄糖分解代谢过程中向甘油合成方向的物质流分配量和甘油合成水平^[5]。赵有玺等^[6]克隆到产甘油假丝酵母产甘油关键酶基因 *gpd1*,并将其在酿酒酵母中表达,发现甘油合成量有显著的提高;陈献忠等^[7]从一株产甘油假丝酵母的工业菌种中成功克隆到 GPDH 的编码基因 *Cg gpd* 的上下游序列,在一定的盐胁迫下将该基因在其它的酵母中异源表达,发现携带 *Cg gpd* 基因的转基因酵母比野生型的酵母有明显的耐渗透压胁迫的能力。但是,甘油含量的提高与 GPD 基因内部的之间的作用机理也未研究透彻,且 *gpd1* 基因的启动子与甘油含量的积累之间的研究未见报道。

利用基因融合来研究现代分子生物学的问题,如基因表达、调控等是非常有效的,GUS(β -葡萄糖苷酸酶)基因是从大肠杆菌中克隆的,作为基因融合系统中的报告基因广泛应用于细菌、植物、甚至动物的基因调控、表达等分子遗传学的研究中^[8]。作者从酿酒酵母 *S. cerevisiae* 中克隆 *gpd1* 的启动子,并构建真核生物穿梭表达载体 pYX212-*zeocin*-PScgpd1-GUS,并将其电击转化入酿酒酵母中。将构建成功的酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌分别在不同 NaCl 浓度的盐胁迫下培养,通过 GUS 组织化学染色法和荧光法测定 GUS 报告基因的瞬时表达酶活检测 *gpd1* 启动子的功能,作者研究酵母甘油代谢关键酶基因 *gpd1* 启动子在不同渗透压下的表达水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 303-1A, *E. coli* JM109 及质粒 pYX212-

zeocin, p3300-*zeocin* 由作者所在实验室保藏。

1.1.2 工具酶和试剂 限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*HI、*Bgl*II、*Sal* I, T4 DNA 连接酶, TaqDNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒,小型 DNA 片断回收试剂盒购自博大泰克公司;氨苄西林,卡那霉素, Zeocin 等抗生素购自上海生物工程有限公司;GUS 基因的底物 X-gluc, 4-甲基伞形酮酰-b-葡萄糖醛苷(4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide, MUG), 4-甲基伞形酮(4-methylumbelliferone, MU)均购自上海生物工程有限公司。

1.1.3 PCR 引物 根据酿酒酵母 *S. cerevisiae* 303-1A 基因组和质粒 pBI121 公布的序列,分别设计基因片段 PScgpd 和 GUS 合成 PCR 所需引物(上海赛百盛基因技术有限公司合成):

P1: 5'-GGAAGATCTGCACGAAATATATGTAGGCAA-3';

P1;5'-CGCGGATTCCCAATATTTGTGTTTGTGGAGG-3';

P3;5'-GGCGGATTCAACGGATGATATACTGACGTAC-3';

P4;5'-CGGAAGCTTCCAATATATATTAAGCGCAGTTA-3'

引物 1, 2, 3, 4 分别在引物上游引入 *Bgl* II, *Bam*HI, *Bam*HI, *Hind*III 酶切位点(下划线部分)。

1.2 方法

1.2.1 菌体的培养 将含有重组质粒 pYX212-*zeocin* *E. coli* JM109, 在含有 50 mg/L kana LB 固体或液体培养基中, 250 r/min, 37 °C 培养过夜。含重组质粒 pYX212-*zeocin*-PScgpd1-GUS 的酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌在含 150 mg/mL *zeocin* 的 YPD 固体或液体培养基中于 250 r/min, 30 °C 培养过夜。

1.2.2 染色体 DNA 制备 参照文献[9]进行。

1.2.3 PCR 反应体系及反应条件 反应体系: 10 × buffer 5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 4 μL , MgCl_2 4 μL , 两条引物各 1 μL , 模板 DNA 2 μL , Taq 酶 1 μL , ddH₂O 33 μL , 总体积 50 μL 。PScgpd1 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 变性 60 s, 55 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 120 s, 30 次循环后, 72 °C 保温 10 °C。GUS 基因 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 变性 60 s, 52 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 120 s, 35 次循环后, 72 °C 保温 10 °C。

另外, PCR 产物胶回收, Pscgpd1 和 GUS 与 pMD-18TEasyvector 连接、转化及质粒提取均参照试剂盒说明书。

1.2.4 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌的构建

1) 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 表达载体的构建: 首先将 PCR 来源于酿酒酵母染色体和载体 pBI121 的目的基因 *PScgpd1* 和 *GUS* 分别连入载体 PMD-18T, 得到重组质粒 PMD-18T-*PScgpd1*, PMD-18T-*GUS*。然后分别用 *Bgl* II, *Bam*HI 及 *Bam*HI, *Hind*III 双酶切重组质粒 PMD-18T-

PScgpd1, PMD-18T-*GUS*, 分别得到 1.1 kb 和 2.1 kb 的目的基因 *PScgpd1* 及 *GUS*, 并将其依次连入表达载体 pYX212-zeocin, 得到重组表达载体 pYX212-zeocin-*PScgpd1*-*GUS*, 见图 1。随后将连接产物转化 *E. coli* JM109。挑取转化子, 提取重组质粒 pYX212-zeocin-*PScgpd1*-*GUS* 经 PCR 和酶切验证, 见图 2。

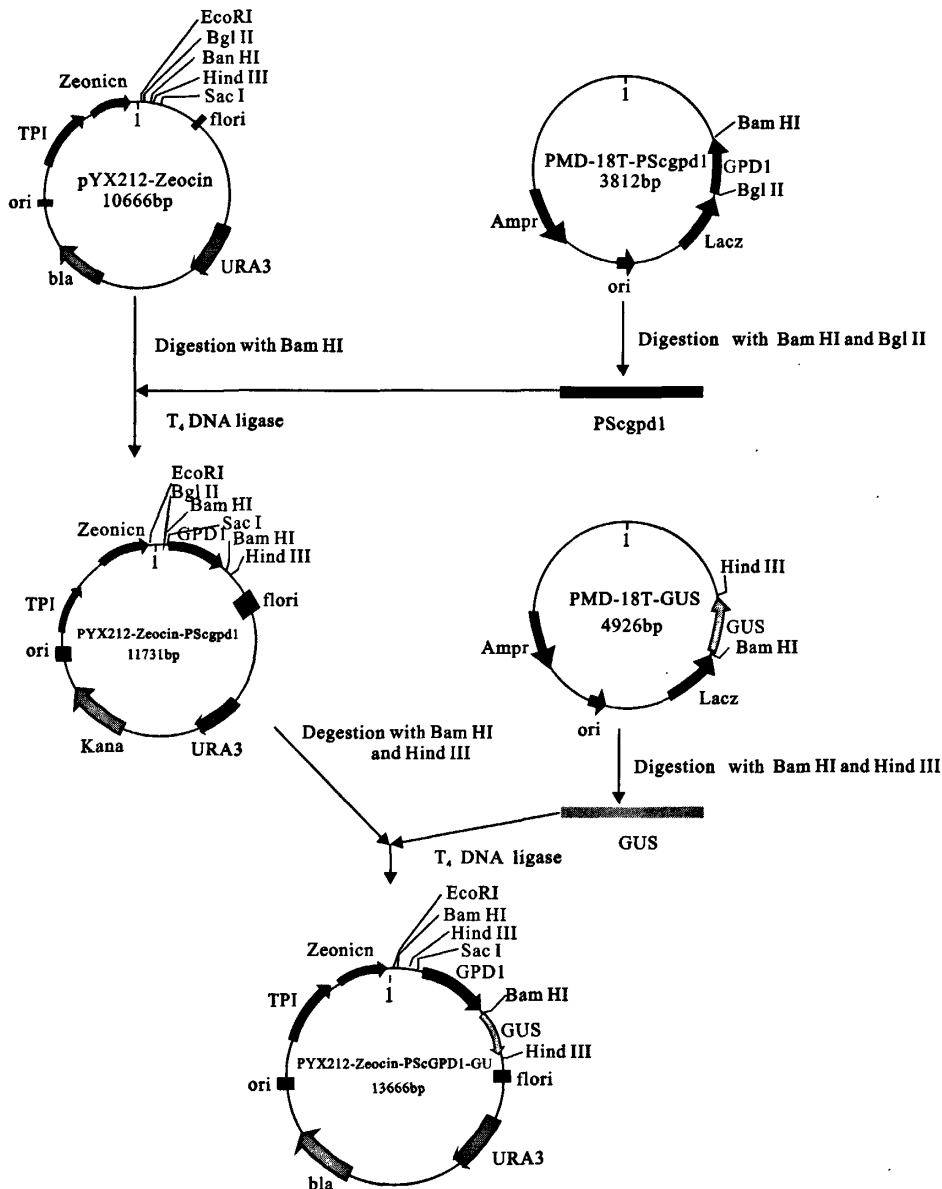


图 1 质粒 pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS

2) 重组质粒电击转化酿酒酵母 加 5 μ L 的酵母表达载体 pYX212-zeocin-*PScgpd1*-*GUS* 质粒于酿酒酵母感受态菌液中预冷 5~10 min, 混合并转

移至无菌预冷的电击杯中(电击间距为 0.1 cm)。迅速吸干电击杯表面的水, 将电击杯放入点转仪的电击之间, 在 1 800 V 的电压下电击 5 ms, 取出电击

杯,迅速加入 1 mL LB 液体培养基混匀,并转移至 1.5 mL 的离心管中。在 28 ℃ 下振荡孵育培养 3 h,离心 1 min,取下层悬浮菌液涂布于含相应质量浓度 zeocin 的选择培养基上,28 ℃ 培养 2~3 d。将得到的重组转化子提取重组质粒 pYX212-zeocin-PScgpdl-GUS,并进行酶切验证^[10]。

1.2.5 SDS-PAGE 采用 5 g/dL 浓缩胶及 12 g/dL 分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白质分离,考马斯亮蓝 G-250 染色,以酿酒酵母 *S. cerevisiae* W30321A 作为对照^[11]。

1.2.6 GUS 的瞬时表达

1) GUS 的组织化学染色:提取含质粒 pYX212-zeocin-PScgpdl-GUS 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌的转化子接种于 YPD 培养基中,培养 8 h 后,以非基因工程菌作为对照,于 30 ℃ 培养 18~24 h。取培养好的转基因酵母培养液 10 mL,离心收集细胞,置于 20 mL 固定液 V (95% 的乙醇):V(冰醋酸)=3:1,室温下固定酵母细胞 30 min,离心收集细胞,然后将细胞浸泡于染色液(50 mmol/L PBS 缓冲液,5 mmol/L 铁氰化钾,5 mmol/L 亚铁氰化钾,0.3 g/dL X-葡萄糖醛酸苷酸和 0.5 g/dL TritonX-100)中,37 ℃ 下保温过夜,显微镜下观察。

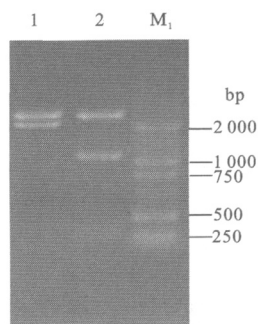
2) GUS 的荧光法测定:提取含质粒 pYX212-zeocin-PScgpdl-GUS 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌的转化子,培养 8 h 后,分别接种在添加有 0.2, 0.5, 1.0 mol/L NaCl 的 YPD 培养基中,分别以非基因工程菌和不加 NaCl 胁迫培养的基因工程菌作为对照,于 30 ℃ 培养 18~24 h。取培养好的转基因酵母培养液 10 mL,离心收集细胞,置于 20 mL GUS 提取溶液(50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7.0, 10 mmol/L Na_2EDTA , 0.1 g/dL Triton X-100, 10 mmol/L β -巯基乙醇,0.1 g/dL 十二烷基肌酸钠)中,与 400 W 超声波破碎 20 min,用 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管在小型离心机上离心破碎 5 min;分别将 100 μL 上清液转移到 2 个试管中,一个标记为 0,一个为 60;向标记为 0 的试管中加入 900 μL 的终止液;将 2 个试管放到冰浴上,加入 100 μL 的检测溶液(提取液中含有 1 mmol/L 的 4-甲基伞形酮酰-b-葡萄糖醛苷, MUG);轻轻摇动试管将溶液混匀,将标有 60 的试管放在 37 ℃ 水浴中 1 h;60 min 后,向标有 60 的试管中加入 900 μL 的终止液(0.2 mmol/L Na_2CO_3);在激发光 365 nm、发射光 455 nm 下测各样品的荧光,以反应终止液为空白溶液,用荧光仪测定甲基伞酮(MU)的浓度。以单位时间

内单位蛋白质产生 4-methylumbelliferone(MU)的量比较各启动子对 GUS 基因表达的影响,每个梯度做 3 个平行对照,取各梯度的平均值进行比较。

2 结果与分析

2.1 T-GPD 和 T-GPP 的构建

通过 PCR 成功扩增了 PScgpdl 与 GUS 基因,将 PScgpdl 与 GUS 基因分别与 pMD-18T Easy vector 连接,转化 *E. coli* JM109。挑取白色转化子,过夜培养,提取质粒。然后用 EcoR I 酶切验证质粒,酶切有 2.7 kb 和 1.1 kb 左右条带的为 T-PScgpdl 阳性克隆,酶切有 2.7 kb 和 2.1 kb 左右条带的为 T-GUS 阳性克隆,见图 2。



M₁. λ DNA/*Hind* III markers; 1. Double digestion of pMD-18T-PScgpdl by *Bgl* II and *Bam*HI; 2. Double digestion of pMD-18T-GUS by *Bam*HI and *Hind*III

图2 pMD-18T-PScgpdl, pMD-18T-GUS 酶切验证

Fig. 2 Restriction map of pMD-18T-PScgpdl and pMD-18T-GUS

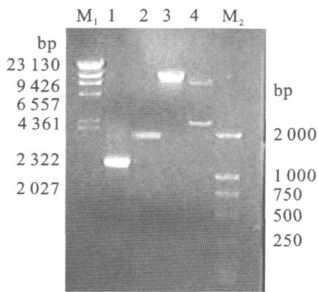
2.2 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 表达载体的构建

挑取转化子,提取重组质粒 pYX212-zeocin-PScgpdl-GUS,经 PCR 分别得到 PScgpdl-GUS 基因片段约 1.1 kb 和 GUS 基因片段约 2.1 kb;同时用 *Sac* I 和 *Hind*III 双酶切,得到质粒的两个片段分别为 10.6 kb 和 3.2 kb,这与连接前的基因片段大小是一致的,见图 3。

2.3 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌的获得

将重组构建得到的酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌表达载体 pYX212-zeocin-PScgpdl-GUS 电击转化酿酒酵母,将电击后的悬浮菌液涂布于含 150 mg/mL zeocin 的 YPD 固体选择培养基上,30 ℃ 静置培养 2~3 d。挑取转化子,接种于 150 mg/mL zeocin 的 YPD 液体选择培养基中,在 250 r/min 30 ℃ 下培养 18~20 h,提取重组质粒 pYX212-zeocin-PScgpdl-GUS,用 *Sac* I 和 *Hind*III 双酶切质粒 pYX212-zeocin-PScgpdl-GUS,得到两个片段分别为 10.6 kb 和 3.2 kb,与预期结果一致,说明

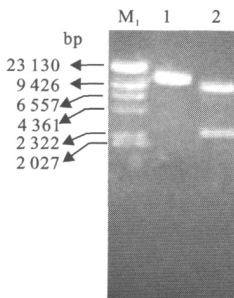
酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌已经构建成功, 见图 4。



M₁. λ DNA/*Hind* III markers; 1. Production PScgpd1 of PCR from plasmid of pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS; 2. Production GUS of PCR from plasmid of pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS; 3. pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS/*Eco*RI; 4. Double digestion of pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS by *Sac*I and *Hind*III; M₂. DL2000 markers.

图 3 质粒 pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS 的 PCR 及酶切验证

Fig. 3 Analysis of plasmid of pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS by PCR and digestion



M₁. λ DNA/*Hind* III markers; 1. pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS/*Eco*RI; 2. Double digestion of pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS by *Sac*I and *Hind*III; M₂. DL2000 markers

图 4 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌的验证

Fig. 4 Confirmation of *S. cerevisiae* transformants

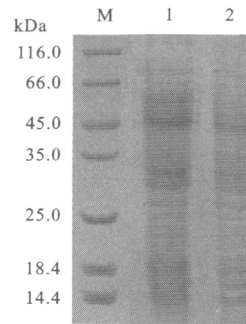
2.4 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

将重组酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS 离心收集菌体, 超声波破壁, 进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白质电泳分析, 见图 5。以酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 为对照, 发现重组酵母在 64 000 处出现蛋白质特征带, 与文献报道的目的蛋白质大小相符。

2.5 渗透胁迫对 GPD1 启动子表达的影响

从图 6 可见, 经过 GUS 基因的组织化学染色后, 非基因工程菌完全没有蓝色沉淀, 即无 GUS 表达(图 6a); 同时, 转入了质粒 pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS 的转基因酿酒酵母 *S. cerevisiae*, 染色后在酵母细胞内出现蓝色沉淀(图 6b), 即在酿酒酵母

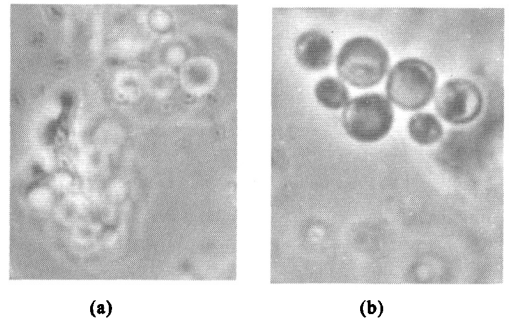
中 PScgpd1 启动子成功的启动了 GUS 基因的表达。



1. *S. cerevisiae* W30321/pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS; 2. *S. cerevisiae* W30321A(control); M. Protein markers (kDa)

图 5 重组菌全细胞蛋白 SDS2PAGE 电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells



a. 酿酒酵母 *S. cerevisiae*; b. 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌
图 6 不同渗透压下 GUS 基因的瞬时组织化学染色

Fig. 6 Transient histochemical analysis of GUS gene under different osmotic pressure

由于表达载体 pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS 中, GUS 融合蛋白基因的表达由 *gpd1* 启动子驱动 GUS 报告基因的表达, 因此通过 GUS 基因的瞬时组织化学染色法分析 GUS 报告基因的表达水平, 可以间接反应出 *gpd1* 启动子的表达水平的情况。从图 7 可见, 当无渗透压胁迫, 即在没有 NaCl 盐胁迫处理的情况下, 转基因酵母内的 GUS 活性不及经盐胁迫处理后的高, 且在一定胁迫范围内 GUS 的活性随着胁迫力度的加大而上升, 0.8 mol/L NaCl 盐胁迫时达到最高。但是由于酿酒酵母的抗渗透压胁迫能力有限, 因此 NaCl 胁迫处理力度的进一步加大使细胞开始死亡, 并且不启动 GUS 基因。综上所述, 可以充分说明, 在盐胁迫处理条件下, 酵母菌内的 PScgpd1 启动子的表达明显强于未经胁迫处理的酵母菌, 且 PScgpd1 启动子是受盐胁迫调控的诱导型启动子。

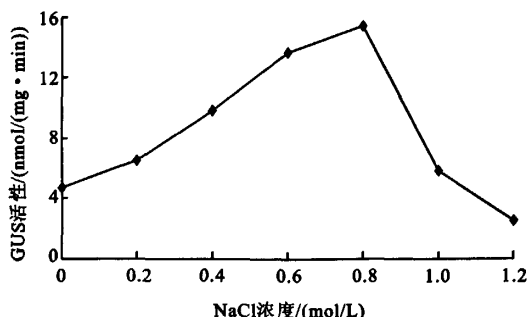


图7 不同NaCl浓度胁迫下GUS表达活性

Fig.7 GUS activity under different NaCl osmotic stress

3 结 语

PScgpd1 启动子为酵母内甘油代谢主要关键限速酶 *gpd1* 的启动子,决定着该酶基因的表达,而甘油又是良好的耐渗透压调节剂,过量的合成甘油可

以提高生物体对外界环境的耐受能力。作者利用PCR方法成功克隆到酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 甘油代谢关键酶基因 *gpd1* 启动子,构建了真核生物穿梭表达载体 pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS,并通过电击转化的方法将其电击转化入酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 中得到酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS 基因工程菌。将构建成功的酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-PScgpd1-GUS 基因工程菌分别在 0.2, 0.5, 1.0 mol/L NaCl 的盐胁迫下培养,通过 GUS 组织化学染色法测定 GUS 报告基因的瞬时表达酶活来检测 *gpd1* 启动子的表达情况。研究发现,酵母甘油代谢关键酶基因 *gpd1* 启动子在不同渗透压下的表达有明显的差异,且随着盐胁迫力度的加大,*gpd1* 表达量也相应增加,证实了 *gpd1* 启动子是受渗透压调节的,属于诱导型启动子。

参考文献(References):

- [1] Mohammad J Taherzadeh, Lennart Adler, Gunnar Lidén. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol—a review[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002,31:53—66.
- [2] Anne Mette Wolff, Jose Arnau. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2002,35:21—29.
- [3] Yasuo Watanabe, Syoko Tsuchimoto, Youichi Tamai. Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*Zrgpd1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2004(4):505—510.
- [4] Grant A Bitter, Kevin M Egan. Expression of interferon-gamma from hybrid yeast GPD promoters containing upstream regulatory sequences from the GAL1-GAL10 intergenic region[J]. *Gene*, 1988,69:193—207.
- [5] Stefan Hohmann, Marcus Krantz, Bodil Nordlander. Yeast osmoregulation[J]. *Methods in Enzymology*, 2007,428:29—45.
- [6] 赵有玺,饶志明,沈微,等;产甘油假丝酵母产甘油关键酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26 (1): 38—41.
ZHAO You-xi, RAO Zhi-ming, SHEN Wei, et al. Expression of key enzymes in glycerol synthesis of *Candida glycerogenesis* in *Saccharomyces cerevisiae* W30321A[J]. *China Biotechnology*, 2006, 26 (1): 38—41. (in Chinese)
- [7] Chen Xian-zhong, Rao Zhi-ming, Shen Wei, et al. Cloning and characterization of an NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer[J]. *FEMS Yeast Res*, 2008, (online, DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00382x)
- [8] 韦莉莉,樊妙姬,陈丽梅. GUS 基因的概述[J]. 广西农业大学学报, 1998, 17(3): 299—301.
WEI Li-li, FAN Miao-ji, CHEN Li-mei. An review on GUS Gene[J]. *Journal of Guang Xi Agricultural University*, 1998, 17(3): 299—301. (in Chinese)
- [9] Guthrie C, Fink R G. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology[M]. California: Academic Press Inc, 1991:195—299.
- [10] 金田辛,包慧中,赵丽云. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [11] Joseph S, David W R. Molecular Cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] 耿德贵,王义琴,李文彬,等; GUS 基因在杜氏盐藻细胞中的瞬时表达[J]. 高技术通讯, 2002(2): 35—39.
GENG De-gui, WANG Yi-qin, LI Wen-bin, et al. Transient expression of GUS Gene in *Dunaliella salina* [J]. *High Technology Letters*, 2002(2): 35—39.

(责任编辑:李春丽)