

生物育种与工艺优化

光质对工程聚球藻 7002 生长及 psbA 启动子的调控

孙溢华¹, 张春莉², 施定基³, 贾晓会¹, 贾睿¹, 何培民¹

1 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

2 Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Max-von-Laue-Str.3, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

3 中国科学院植物研究所, 北京 100093

孙溢华, 张春莉, 施定基, 等. 光质对工程聚球藻 7002 生长及 psbA 启动子的调控. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1286–1290.

Sun YH, Zhang CL, Shi DJ, et al. Effects of light quality on cell growth and psbA promoter of engineered *Synechococcus* sp. PCC7002. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1286–1290.

摘要: 工程聚球藻的 *psbA* 基因及其所用载体的启动子 PpsbA 均受光质调控, 利用该机制可通过光质调控提高聚球藻的光合效率及其外源基因表达率。以转 *vp28* 基因聚球藻 7002 为实验材料, 通过优化光强、温度及 pH, 解除光限制因素并提高光能利用率。通过改变白光、红光及蓝光的比例, 调控光质组成及单色光的光强, 检测细胞生长、外源基因的表达及 *psbA* 基因的转录。研究表明: 高比例蓝光下, *vp28* 基因的表达率达到 2.4%, 是纯白光下的 3 倍, 重组蛋白 VP28 的积累量提高至 2 倍。高比例红光抑制了 *psbAII*、*psbAIII* 基因及外源基因的表达, 但促使生物量在 3 d 内突破 1.5 g/L。本研究为蓝藻的生物制药和工程蓝藻代谢产物的产业化提供了理论基础。

关键词: 光生物反应器, 聚球藻 7002, psbA 启动子, VP28, 光质调控, psbA

Effects of light quality on cell growth and psbA promoter of engineered *Synechococcus* sp. PCC7002

Yihua Sun¹, Chunli Zhang², Dingji Shi³, Xiaohui Jia¹, Rui Jia¹, and Peimin He¹

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Max-von-Laue-Str.3, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

3 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: Light quality can regulate both *psbA* genes and vector promoter psbA of the engineered *Synechococcus*. Through light regulation, we tried to improve yield of the recombinant protein for *vp28* gene-expressed *Synechococcus* sp. PCC7002. To drive photon-capturing efficiently, three limiting factors (irradiance, temperature and pH) were optimized by measuring net photosynthesis. High cell density cultures were performed with variant ratios of white, red and blue light in a 5-L photo-bioreactor. Yields of biomass, expressions of *vp28* and transcription levels of *psbA* were compared. High ratio blue light-induced *vp28* transcription had tripled and the relative accumulation of VP28 protein was doubled. The relative expressions of *psbAII* and *psbAIII* had positive correlations with higher ratio of blue light, not the red light. With high ratio red light inducing, dry biomass reached 1.5 g/L in three days. Therefore, we speculated that red light accelerated biomass accumulation of the transgenic strain and blue light promoted transcription for PpsbA and *psbA*. These results provided useful information for mass production of cyanobacteria and its secondary metabolites.

Keywords: biophotoreactor, *Synechococcus* sp. PCC7002, psbA promoter, VP28, light quality regulation, psbA

Received: January 3, 2016; **Accepted:** January 29, 2016

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA093506).

Corresponding author: Rui Jia. Tel: +86-21-61900449; E-mail: rjia@shou.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA093506) 资助。

网络出版时间: 2016-02-03

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160203.1100.002.html

随着蓝藻的产业化发展,光质调控已成为提高生物量及目的产物表达的重要途径^[1-3],转录因子介导的光调控机制逐步被揭示^[4]。光质是光源所包含的所有单色光的光强及波长的总称,直接影响藻细胞的光合作用及代谢途径。聚球藻光系统II的捕光天线主要受 *psbA* 基因的调控^[5],*psbA* 基因对光质具有较敏感响应机制^[6]。同时,工程蓝藻常用的载体启动子 PpsbA^[7]与蓝藻的 *psbA* 基因同源^[8],蓝光与红光分别诱导的信号通路可同时调节蓝藻本身的 *psbA* 基因及其载体启动子 PpsbA^[9]。然而,相对于野生蓝藻,转基因蓝藻的最适光合条件已有显著改变^[10],若要研究光质对于 *psbA* 基因及 PpsbA 的调控,必须先排除光合作用的干扰因素(总光强、温度与 pH),以达到最大光合效率。

新型光生物反应器(SDJ,上海联环生物工程设备有限公司)可对总光强、温度、pH、光质进行精确调控,能够使藻细胞达到最大光合效率,是工程蓝藻研究及产业化探索的重要工具。光生物反应器配备的LED光源可提供稳定的光质(红光615–630 nm,蓝光440–475 nm),已普遍应用于微藻培养^[11]。研究发现,相同LED光质对于不同藻种的影响显示出差异,例如蓝光促进拟绿球藻 *Nannochloropsis* sp. 细胞增殖^[12],却会抑制小球藻 *Chlorella* sp. 的生长并促进其油脂积累^[13]。因此,研究LED光质对工程蓝藻生长的影响是产业化的必要途径。

白斑综合症病毒(WSSV)于1992年首先在中国台湾地区发现,20年来WSSV在亚洲、南北美洲、欧洲和非洲造成的经济损失已超过70亿美元,尚未见在规模生产中应用有效药物来防治^[14]。Witteveldt等^[15]首次用大肠杆菌表达的VP28(WSSV被膜中的结构蛋白)经口服和注射接种,可提高对虾抗WSSV的能力。Jia等^[10]使用转 *vp28* 基因蓝藻,经口服后攻毒,成功提高了对虾的成活率,证明口服转基因蓝藻能有效抵抗WSSV。工程蓝藻口服剂的研制已进入中试阶段,其中工程蓝藻的规模培养是产业化的基础。聚球藻属 *Synechococcus* sp. 由于适合光反应器培养,已被广泛用于规模培养的研究^[16],因此转 *vp28* 基因聚球藻 7002^[17]在产业化上非常具有前景。

1 材料与方 法

1.1 转 *vp28* 基因聚球藻的摇床培养

转 *vp28* 基因聚球藻 *S. PCC7002* 由中国科学院植物研究所提供,装在含150 mL BG-11培养基^[18]的250 mL摇瓶中进行培养,温度为30 °C,摇床转速为130 r/min,光照为50 μmol/(m²·s),连续光照。

1.2 净光合作用的单因素试验

聚球藻 7002 的叶绿素浓度通过公式(1)^[19]测定:

$$P = 14.96 \times (A_{678} - A_{750}) - 0.616 \times (A_{720} - A_{750}) \quad (1)$$

式中, P 表示叶绿素浓度(μg/mL); A_{750} 、 A_{720} 、 A_{678} 分别表示750 nm、720 nm、678 nm处的吸光值。将待测藻液的浓度调整至每毫升样品所含叶绿素为10 μg。

净光合速率使用氧电极(Hansatech, UK)测定,温度由恒温水浴箱(Julubo, Germany)通过循环水控制。测定样品在不同条件下的净光合速率(光强,温度,pH)^[20]。净光合速率计算采用公式(2):

$$NPR = S \times Q \times 60 \times 1000 / P \quad (2)$$

式中,NPR(μmol O₂/mg Chl_ah)表示净光合速率(Net photosynthetic rate); S 为记录纸走的斜率(/min); Q 为常数,表示一定温度下水中的溶氧量(mol O₂/mL); P 为样品的叶绿素浓度(mg/mL);60表示60 min;1000表示记录纸的满量程为1000。

1.3 转 *vp28* 基因聚球藻的光生物反应器培养

封闭式光生物反应器为SDJ-5L型光合发酵系统(上海联环生物工程设备有限公司),由全自动圆柱形玻璃反应器及外置LED光源构成。该系统可对pH、温度、光照进行恒定控制,培养条件(光照、温度、pH)按照优化后的指标((300±10) μmol/(m²·s),37 °C,pH 7.5)进行设置。工作体积为3.5 L,初始接种量使藻液 A_{750} 达到0.1±0.02,平均空气流量为1 L/min,平均CO₂的体积分数为0.5%。培养时长为72 h。LED光源采用白、红、蓝进行调控,平均光强测定采用公式(3)^[21]:

$$I_{av} = \left(1 - \int_0^{\pi} \frac{1}{2} (\cos \theta \text{EXP}(-2RK \cos \theta)) \right) \frac{2I}{\pi RK} \quad (3)$$

式中, I_{av} 为平均光强(μmol/(m²·s)); I 为入射光强(μmol/(m²·s)); K 为光衰减系数; R 为反应器半径(m)。聚球藻 7002 的光衰减系数计算采用如下公式(4)^[22]:

$$K = (-2.39 + 7.77A_{750}) \quad (4)$$

式中, K 为光衰减系数; A_{750} 为藻液吸光值。

调控白光、红光、蓝光的配比并设置White、Red、Blue、Balance共4个实验组(表1),通过公式(3)测定并调控平均光强,使得平均光强符合优化的标准((300±10) μmol/(m²·s))。

1.4 *vp28* 表达率测定及 VP28 蛋白检测

Trizol 法提取转 *vp28* 基因聚球藻 7002 的总

表1 光质配比及平均光强

Table 1 The proportions of light quality and average irradiance

Item	White light: Red light: Blue light	I_{av} (μmol/(m ² ·s))
White	6:0:0	294–146
Red	3:2:1	308–138
Blue	3:1:2	292–171
Balance	2:2:2	303–154

RNA。以总 RNA 为模板,用试剂盒反转录为 cDNA(Tiangen, China)。vp28 序列参照文献[17]并设计 vp28 的 qPCR 引物(表 2)。管家基因 16S rRNA 的引物采用已有模板^[23]。20 μL PCR 反应体系包括 2 μL cDNA, 0.6 μL 正向引物与反向引物, 10 μL SYBRFast qPCR Master Mix (2X) (KAPA, USA)。参照 Jia 等^[10]的方法, 计算 vp28 表达率并用 Western blotting 检测蛋白条带。

1.5 *psbA* 的表达分析

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上找到对应的蛋白序列 *psbAI* (ID: 501262777)、*psbAII* (ID: 501264014)、*psbAIII* (ID: 501264746), 并利用 tblastn 反向定位到聚球藻 7002 基因组全序列 (CP000951) 的对应片段 *psbAI* (region: 1489906-1490985)、*psbAII* (region: 161804-162883)、*psbAIII* (region: 2245055-2246134)。分别设计 qPCR 引物(表 2)。取接种前的样品(藻种)作为参照, 每隔 24 h 对 White、Red、Blue 三个实验组的样品进行检测, 其中 qPCR 方法及反应体系同 1.5。

2 结果与讨论

2.1 pH、光强、温度对藻细胞光合作用的影响

光合作用中,除了光强直接供给电子激活的能量,温度与 pH 对酶活力的影响决定了光合作用的效率^[24]。因此,必须首先排除温度与 pH 的干扰,使得光强的能量最大限度地输入光系统 II, 才能进一步分析出光的成分(光质)对于捕光效果的影响。在温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 7.3 的条件下,研究光强 (50–800 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 对净光合速率的影响(图 1A)。随着光强的增加,净光合速率不断增加。当光强达到 400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时,净光合速率出现下降,从 320 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chlah}$ 左右下降至 281 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chlah}$ 。在光强为 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, pH 为 7.3 的条件下,研究温度 (15–50 $^{\circ}\text{C}$) 对净光合速率的影响(图 1B)。随着温度增加,净光合速率不断增加。当温度达到 40 $^{\circ}\text{C}$ 后,净光合速率突然下降,50 $^{\circ}\text{C}$ 时净光合速率从 320 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chlah}$ 变为 0。在光强为 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,研究 pH 5.5–9.0 对净光合速率的影响

表 2 本实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
vp28-FW	AACCTCCGCAATCCTGTGACTG
vp28-RV	TCCGCAATCTTCTTCATCTGTG
psbAI-FW	CGTATTCCAGGCAGAGCACAACAT
psbAI-RV	GCAGTGAACCAAGATACCGACTACAG
psbAII-FW	ATGTTGTGCTCTGCCTGGAATACG
psbAII-RV	TCACTGCCACCACCTGCTTCA
psbAIII-FW	GCGACTGCTGTGCTCTTGGTT
psbAIII-RV	TCCGTTTCTGTGGTCTCCGAAT

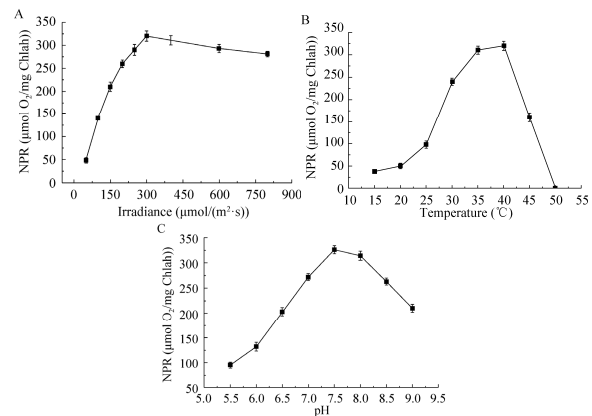


图 1 光强、温度、pH 对净光合速率的影响

Fig. 1 Effect of irradiance, temperature and pH on net photosynthetic rates. (A) Irradiance. (B) Temperature. (C) pH.

(图 1C)。随着 pH 增加,净光合速率不断增加。当 pH 达到 7.5 后,净光合速率开始下降,净光合作用从 326 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chlah}$ 下降至 210 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chlah}$ 。

2.2 藻细胞干生物量的积累

光生物反应器培养的实验中,我们尝试用单色光(蓝光)来培养聚球藻,但细胞生长速度极慢,细胞样品的采集与处理遇到较大困难,并且细胞浓度过低严重影响到基因与蛋白的检测。因此,为了方便实验以及产业化生产的需要,本研究以 3 d 内干生物量达到 1 g/L 为最低标准,进行光质配比的设定。随着细胞密度的升高,入射光强并不能实时反映藻细胞的光能利用率^[22]。从开始培养到结束,藻细胞的光能利用率处于一个由高至低的动态的变化过程。本研究采用平均光强代替入射光作为计量参数^[26],计算出了平均光强的变化范围(表 1),以求反应实际的光能利用率^[11]。White、Red、Blue、Balance 四个实验组 72 h 的干生物量分别为 1.48 g/L、1.68 g/L、1.22 g/L、1.38 g/L。图 3 中,培养前 36 h 内,4 组藻细胞进入对数生长期,干生物量积累速度差异不显著。培养 36 h 后,Red 组与 Blue、Balance 组的干生物量积累速度差异显著,Red 组生长速度最快;Red 与 Blue 组差异极显著,Blue 组明显生长较慢;White 组与 Balance 组差异不显著,生长速度较接近。光生物反应器的验证培养结果表明,在生物量积累上,已经超过了同类实验^[22,25],3 d 内平均干重超过 1.2 g/L。

2.3 *vp28* 基因的表达量与 VP28 蛋白的积累

宁文艳等^[27]提出光调控启动子 PpsbA 是鱼腥藻的高效表达载体,未经光调控的 PpsbA 表达效率是 IPTG 调控下 Ptac 的 1.17 倍。然而尚未有报道指出转基因鱼腥藻的载体启动子 PpsbA 可接受光质调控,未经光调控的转 *vp28* 基因鱼腥藻 7120 的表达

效率只有 0.1%–1%^[10]。转基因聚球藻 7002 所用表达载体为 *pri-489*，启动子为 *PpsbA*^[17]。本文中高比例蓝光促进了 *vp28* 基因的表达，并促进了 *psbAII*、*psbAIII* 的转录，这与 Tsinoremas 等^[9]研究转基因聚球藻 7942 结果一致。图 3 与图 5 的结果证明，载体启动子 *PpsbA* 与光合基因 *psbA* 的转录在时空效应上具有一致性，均受到蓝光的诱导作用。然而外源蛋白 (VP28) 的积累量 (图 4) 差异不如外源基因表达差异明显 (图 3)，这可能是 DNA 转录与 mRNA 翻译的时空差异造成的。图 3 中，White、Red、Blue、Balance 四组 *vp28* 基因表达率总体均呈现上升趋势，前 36 h 内 4 组 *vp28* 表达率都较低。其中，Blue 与 Balance 组表达率较高，White 与 Red 组表达率较低，36 h 后前两组与后两组相比差异明显。Blue 与 Balance 组在前 36 h 及 60 h 后差异不显著，而在 36 h 至 60 h 之间差异明显。White 与 Red 组在 72 h 内差异都不明显。Blue 组中 *vp28* 基因表达率最高达到 2.41%，出现于第 72 h。Red 组中 *vp28* 基因表达率最低达到 0.11%，出现于 12 h。图 4 中，总蛋白条带在 PAGE 上无明显差别，而 VP28 条带在 PVDF 上差异较为明显。灰度值从少到多分别为 Red、White、Balance、Blue，说明 Blue 组蛋白积累量最高，Red 组蛋白积累量最少，并且 Blue 组与 Red 组差异明显。

2.4 *psbA* 的表达差异

图 5 显示，接种后光能利用率较高，*psbA* 转录效率比接种前提高了 50%–75%。White 与 Red 组

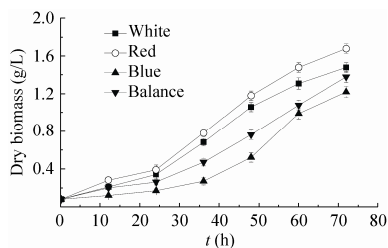


图 2 不同光质组成下干生物量积累曲线
Fig. 2 Variations of dry biomass with various proportions of light quality.

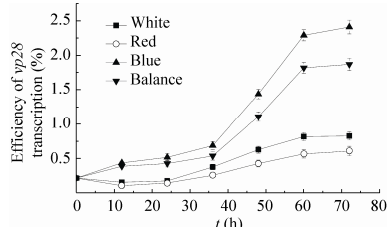


图 3 不同光质组成下 *vp28* 表达率变化曲线
Fig. 3 Variations of *vp28* transcription with various proportions of light quality.

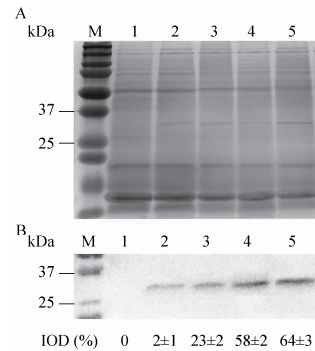


图 4 不同光质组成下 VP28 的相对含量
Fig. 4 Relative accumulation of VP28 in engineered *Synechococcus* sp. PCC7002 with various proportions of light quality. (A) SDS-PAGE analysis of total protein. (B) Western blotting of VP28. M: marker; 1: wild type; 2: red; 3: white; 4: balance; 5: blue.

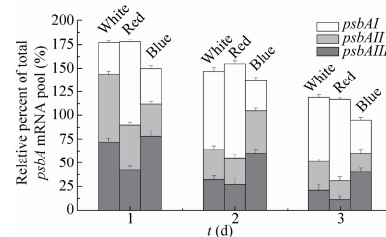


图 5 不同光质组成下 *psbA* 的相对表达量
Fig. 5 Relative transcription of *psbA* genes with various proportions of light quality.

psbA 的总 mRNA 表达量高于 Blue 组。随时间变化，总 *psbA* mRNA 含量呈下降趋势。*psbAI*、*psbAII*、*psbAIII* 在 3 组中都呈下降趋势，其中 *psbAII*、*psbAIII* 在 White 与 Red 组中下降速度较快，*psbAII* 分别从第 1 天的 0.72、0.48 下降至第 3 天的 0.32、0.28，*psbAIII* 分别从 0.72、0.42 下降至 0.21、0.11。而在 Blue 组中，*psbAII* 与 *psbAIII* 的下降速度明显较慢，从第 1 天的 0.34、0.78 分别下降至第 3 天的 0.20、0.40。Blue 组的 *psbAII* 与 *psbAIII* 始终高于 White 与 Red 组，而 Red 组的 *psbAII* 与 *psbAIII* 始终处于较低水平。与纯白光相比，高比例红光并不影响 *psbA* 基因总 mRNA 含量，但最终提高了转基因聚球藻 7002 的干生物量积累；高比例蓝光抑制了 *psbA* 总 mRNA 的含量，从而抑制了干生物量的积累，但促进了 *psbAII* 与 *psbAIII* 的转录。这可能是由于不同比例的红光、蓝光影响了 Rubisco 与碳酸酐酶的活性^[28]，从而影响了碳循环途径。本文中高比例红光促进了生物量的积累，这可能是由于红光诱导了一种以钙调蛋白为二级信使的信号通路^[29]，并促进了 *psbAI* 的表达。

3 结论

本文研究了光质调控对工程聚球藻 7002 生长及 *vp28* 表达的影响, 确定最优光能利用条件, 使得生物量在 3 d 内突破 1.2 g/L。当白光, 红光与蓝光的光强比为 3 1 2 时, 重组蛋白 VP28 表达翻倍。发现蓝光可促进启动子 *PpsbA* 表达 *vp28*, 红光可提高生物量的积累。通过检测基因转录及目的蛋白表达, 证明 *psbA* 基因响应了光质调控。研究结果对工程蓝藻的规模培养、重组蛋白的高效表达、转基因生物制药具有重要的参考价值。

REFERENCES

- [1] Aguilera J, Francisco J, Gordillo L. Light quality effect on photosynthesis and efficiency of carbon assimilation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *J Plant Physiol*, 2000, 157(1): 86–92.
- [2] Niizawa I, Heinrich JM, Irazoqui HA. Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs. *Biochem Eng J*, 2014, 90(5): 214–223.
- [3] Rashid N, Rehman MSU, Han JI. Enhanced growth rate and lipid production of freshwater microalgae by adopting two-stage cultivation system under diverse light and nutrients conditions. *Water Environ J*, 2015, 29(4): 533–540.
- [4] Nesbit AD, Whippo C, Hangarter RP. Translation initiation factor 3 families: what are their roles in regulating cyanobacterial and chloroplast gene expression? *Photosynth Res*, 2015, 126(1): 147–159.
- [5] Zouni A, Witt HT, Kern J, et al. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 2001, 409(6821): 739–743.
- [6] Tsinoremas NF, Schaefer M, Golden SS. Blue and red light reversibly control *psbA* expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Biol Chem*, 1994, 269(23): 16143–16147.
- [7] Ma WM, Shi DJ, Wang QX, et al. Exogenous expression of the wheat chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase gene enhances photosynthesis in the transgenic cyanobacterium, *Anabaena* PCC7120. *J Appl Phycol*, 2005, 17(3): 273–280.
- [8] Bergsland KJ, Haselkorn R. Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC7120. *J Bacteriol*, 1991, 173(11): 3446–3455.
- [9] Tsinoremas NF, Kawakami A, Christopher DA. High-fluence blue light stimulates transcription from a higher plant chloroplast *psbA* promoter expressed in a cyanobacterium, *Synechococcus* (sp. strain PCC7942). *Plant Cell Physiol*, 1999, 40(4): 448–452.
- [10] Jia XH, Zhang CL, Shi DJ, et al. Oral administration of *Anabaena*-expressed VP28 for both drug and food against white spot syndrome virus in shrimp. *J Appl Phycol*, 2015, doi: 10.1007/s10811-015-0607-4.
- [11] Cornet JF, Dussap CG, Gros JB. Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors// *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*. Berlin Heidelberg: Springer, 2007: 153–224, doi: 10.1007/BFb0102299.
- [12] Das P, Wang L, Sarah AS, et al. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol*, 2011, 102(4): 3883–3887.
- [13] Shu CH, Tsai CC, Liao WH, et al. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*, 2012, 87(5): 601–607.
- [14] Seibert CH, Pinto AR. Challenges in shrimp aquaculture due to viral diseases: distribution and biology of the five major penaeid viruses and interventions to avoid viral incidence and dispersion. *Braz J Microbiol*, 2012, 43(3): 857–864.
- [15] Witteveldt J, Cifuentes CC, Vlak JM, et al. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol*, 2004, 78(4): 2057–2061.
- [16] Niki K, Aikawa S, Yokono M, et al. Differences in energy transfer of a cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7002, grown in different cultivation media. *Photosynth Res*, 2015, 125(1/2): 201–210.
- [17] Zhang CL. Cloning of envelope protein *vp28* gene of WSSV and its expression in cyanobacteria[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2002 (in Chinese). 张春莉. WSSV 囊膜蛋白 VP28 基因在蓝藻中克隆和表达[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2002.
- [18] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev*, 1971, 35(2): 171–205.
- [19] Packer L, Glazer AN. *Methods in Enzymology: Cyanobacteria*. San Diego: Academic Press, 1988: 766–778.
- [20] Shi DJ, Zhou GF, Fang SX, et al. Studies on photosynthesis, respiration and morphology of *Nostoc flagelliforme*. *Acta Bot Sin*, 1992, 34(7): 507–514.
- [21] Grima EM, Camacho FG, Pérez JAS, et al. Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance. *Enzyme Microb Tech*, 1997, 21(5): 375–381.
- [22] Kang RJ, Zhou WQ, Cai ZL, et al. Photoautotrophic cultivation of *Synechococcus* sp. PCC7002 in photobioreactor. *Chin J Biotech*, 2000, 16(5): 618–622 (in Chinese). 康瑞娟, 周文齐, 蔡昭铃, 等. 聚球藻 7002 在光生物反应器中的光自养培养. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 618–622.
- [23] Pinto F, Pacheco CC, Ferreira D, et al. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in cyanobacteria. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e34983.
- [24] Moore LR, Goericke R, Chisholm SW. Comparative physiology of *synechococcus* and *prochlorococcus*—influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Mar Ecol Prog Ser*, 1995, 116: 259–275.
- [25] Zeng WL, Zhao FF, Cao ZG, et al. Medium optimization by response surface method for transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with mouse metallothionein-I gene. *Chin J Biotech*, 2008, 24(1): 130–136 (in Chinese). 曾文炉, 赵飞飞, 曹照根, 等. 利用响应面方法优化转小鼠金属硫蛋白-I 基因聚球藻 7002 的培养基成分. *生物工程学报*, 2008, 24(1): 130–136.
- [26] Camacho-Rubio F, Padiál-Vico A, Martínez-Sancho ME. The effect of the mean intensity of light on the cultivation of *Chlorella pyrenoidosa*. *Int Chem Eng*, 1985, 25(2): 283–288.
- [27] Ning WY, Wu XM, Wang CM, et al. Efficiency comparison of promoters *Ptac* & *PsbA* driving hG-CSF expression in *Anabaena* sp. PCC7120. *J Microbiol*, 2014, 34(3): 36–41 (in Chinese). 宁文艳, 吴先敏, 王春梅, 等. 启动子 *Ptac* 与 *PsbA* 在鱼腥藻 7120 中表达 hG-CSF 的效率比较. *微生物学杂志*, 2014, 34(3): 36–41.
- [28] Roscher E, Zetsche K. The effects of light quality and intensity on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and its mRNAs in the green alga *Chlorogonium elongatum*. *Planta*, 1986, 167(4): 582–586.
- [29] Alizadeh D, Cohen A. Red light and calmodulin regulate the expression of the *psbA* binding protein genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(3): 312–322.

(本文责编 郝丽芳)