

鱼腥藻 7120 遗传转化的研究进展

陈伟东¹ 王春梅^{1*} 施定基^{2,3}

(1. 北京中医药大学 中药学院 北京 100102)

(2. 天津科技大学海洋科学与工程学院 天津 300450)

(3. 中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘要: 鱼腥藻 7120 作为模式生物被广泛用于光合、固氮、进化、代谢等基本生命现象的研究。近几年,对其基因工程的研究使人们看到它在医药、环保、能源等方面的应用潜力,但表达效率低是其发展的瓶颈。为了提高其表达效率,研究者从鱼腥藻 7120 的载体(包括启动子、复制子、选择标记基因等)的改进、目的基因的优化(密码子和 SD 序列)、宿主的改善、转化方法的改变等方面进行了大量探索,除了用于功能基因的研究,已经有几十个外源基因在鱼腥藻 7120 中表达。除了研究载体,诱变鱼腥藻 7120 形成有利于外源基因表达的突变体和摸索转基因蓝藻最佳生长条件和表达条件,可能是新的发展方向。

关键词: 鱼腥藻 7120, 遗传转化, 基因工程, 载体

Advances on the Genetic Transformation of *Anabaena* sp. Strain PCC7120

CHEN Wei-Dong¹ WANG Chun-Mei^{1*} SHI Ding-Ji^{2,3}

(1. Department of Biopharmaceuticals, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

(2. School of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300450, China)

(3. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: *Anabaena* sp. strain PCC7120, an ancient group of photosynthetic prokaryotes, have served as an excellent model system for analysis of fascinating biological phenomena such as photosynthesis and its regulation, cell differentiation and N₂ fixation, metabolism of nitrogen, carbon, and hydrogen, resistance to environmental stresses and molecular evolution. Apart from excellent basic research on heterocyst development and gene rearrangements, *Anabaena* strains have been extensively investigated for biotechnological applications such as production of drug and food, nitrogen biofertilizer, for hydrogen production and ammonia excretion, pesticides infested soils, bioremediation of oil, and production of biological fuel. However, the low expression rate was the neck for the use of this system. To improve the foreign protein expression rate, genetic transformation system of *Anabaena* sp. strain PCC7120 were extensively investigated such as vector (including promoter, reproducer, select marker etc.), foreign gene modification (codon and SD sequence),

基金项目: 留学回国人员科研启动经费项目

*通讯作者: Tel: 86-10-84738646; 信箱: wchunmei@126.com

收稿日期: 2009-10-11; 接受日期: 2009-12-14

host adjustment, transformation method. Besides used for gene function research, *Anabaena* PCC7120 was used as host expressed many foreign proteins. Constructing *Anabaena* PCC7120 mutant and finding the best culture condition specially for expressing foreign proteins may be one of the new research directions.

Keywords: *Anabaena* sp. strain PCC7120, Genetic transformation, Genetic engineering, Vectors

蓝藻是一种光合自养原核生物。作为一种非常好的模式生物,被广泛用于光合、固氮、环境压力、分子进化和氮、碳、氢的代谢等生命现象的研究,最近又被用于生物技术产品研发、生物能源研究、水质污染降解、蚊子控制等应用方面的研究^[1]。其中鱼腥藻 7120 属于丝状蓝藻的一种,它不仅具有营养细胞,而且还具有异型胞,因此既能用于光合作用的研究,又能用于细胞分化和固氮作用的研究,是蓝藻中最常用的模式生物之一,它的基因组序列测定也是丝状蓝藻中最早被完成的^[2]。

在遗传转化方面,对鱼腥藻 7120 的研究是最充分的。自从 1984 年 Wolk 等人第一次报道以鱼腥藻 7120 作为转化体系进行研究^[3]到现在,已有多种外源基因在鱼腥藻 7120 中成功表达,该蓝藻的转化体系已经基本建立起来,并成为研究基因功能及表达基因产物的重要工具^[4-7]。2001 年其基因组的序列测定完成^[2],又进一步促进了鱼腥藻 7120 转化体系的研究。然而与其他蓝藻一样,外源基因在鱼腥藻 7120 中表达效率低的问题一直是其发展的瓶颈,所以对该转化系统进行改进,提高外源基因的表达效率就成为了科研工作者的主攻方向。因此本文阐述了鱼腥藻 7120 转化体系的载体、转移系统及宿主细胞等的研究进展,为相关研究者提供有实用价值的参考。

1 载体的研究

鱼腥藻 7120 转化体系的基因操作有 3 个关键因素:载体、目的基因和宿主。这三要素结合起来才能把目的基因运载到受体细胞内。其中载体是使目的基因和宿主发生联系的桥梁和纽带。到目前,应用于蓝藻遗传转化的载体可分为 3 类:第 1 类是直接利用未修饰的外源质粒,效率很低;第 2 类是利用自身染色体或基因组,通过同源重组作为插入突变的有效方法;第 3 类就是穿梭载体,它既能在大肠杆菌中扩增,又能在蓝藻中表达,越来越多的蓝藻的遗传转化都采用了穿梭载体作为中介^[4-7]。

为了提高外源基因在鱼腥藻 7120 中的表达效率,

人们把研究的重点放在载体的各个基本元件上。

1.1 启动子

曾用于鱼腥藻 7120 基因工程研究的启动子有 Pgl_nA、PrbcL、PrbcA、Ptac、PpetE、PpsbBI、PpsbBII、P_{furA}、PpsbA 及 Pcbcβ 等。

与营养细胞和异型胞相适用的启动子之间是有差别的。在两种细胞中均能发挥作用的启动子有 Pgl_nA^[8]、PpsbB、PntcA^[9]启动子。nifHDK 操纵子的启动子只能在异型胞中启动转录,300 bp 的 nifH 启动子在营养细胞中不能启动转录,但 700 bp 的 nifH 启动子(保留了 nifH 启动子上游区域)却能在营养细胞中启动转录,并且当在其反方向加上 tet 基因启动子时,表达效率明显提高^[9];鱼腥藻 7120 furA 基因的启动子 P_{furA} 在未成熟的异型胞原中有很强的活性,且在成熟的异型胞中仍能过度表达^[10]。

此外,启动子在载体中的位置和启动方向对启动子发挥作用也有影响。穿梭表达载体 pRL305^[11] 含有来自 7120 的启动子 PrbcA,当该启动子在外源基因 lux 上游正向调节时, lux 的表达比启动子反向调节时大。1993 年 Reddy 等^[12]用鱼腥藻 7120 表达集胞藻 6803 的 Δ⁶-脱氢酶基因,当启动子 rbcLS 与该基因同向时,能表达大量产物,反向则不能表达产物。

要使外源基因高效表达,应选用强启动子。鱼腥藻 7120 转化体系用得最多的强启动子是 PpsbA^[13-14]。它是 1993 年后载体应用最多的启动子之一,如穿梭表达载体 pRL488p、pSBJ2^[15] 和 pKT-MT^[6]以及国内^[16-18]几乎所有的鱼腥藻 7120 转化体系都是利用该启动子来启动转录的。

构建双启动子表达载体也可以提高外源基因的表达效率。研究发现 psbB 基因有两个启动子,且都能各自启动转录^[19],含有两个启动子时表达效率要高于只含其中一个启动子的表达效率。穿梭表达载体 pSBJ2 含有 PpsbA 和启动子 P/O(由 T7 启动子 P_{A1} 和两个 lacO 操纵子结合而成)^[15],它的表达效率高于只含一个启动子 PpsbA 的载体。2001 年李艳等人也构建了含有可诱导型强启动子 PpetE 和强启动子

PpsbA 的双启动子表达载体^[20]。

要提高外源基因表达效率, 还可用诱导型启动子。目前用于鱼腥藻 7120 的诱导型启动子有: 受氮源诱导的营养细胞中的强启动子 PrbcL^[8]和 Pnir^[21]、铁离子诱导的 PnifJ 启动子^[9]、铜离子诱导的 PpetE 启动子^[22-23]、ITPG 诱导的 Ptac 启动子^[24-25]。另外研究发现鱼腥藻 7120 的 all3575-alr3576 基因和 alr5134 基因的启动子区域存在锰反应调节素 (ManR) 的结合位点^[26], 有可能发展锰离子诱导的启动子。研究还发现在缺乏铁离子的条件下, 鱼腥藻 7120 中的 alr0397、all1101、alr2153 和 alr2581 基因能够被诱导表达^[27], 它们的启动子将作为一种缺铁诱导启动子用于研究。还有一种受红光诱导的启动子来源于聚球藻 7002 中编码藻蓝蛋白基因 cpc β 的启动子 Pcp β , 利用该启动子在 7120 中表达人粒巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF)^[28], 基因的表达水平比用 PpsbA 启动子载体提高了 90%。

从启动子的研究结果我们可以发现要使外源基因高效表达应选择强的可诱导的启动子, 或构建双启动子型表达载体。并且启动子在载体上的位置与指向对外源基因的表达是有一定影响的。只有位置和启动方向正确, 外源基因才能表达。大部分强启动子都是在研究蓝藻相关基因时发现的, 所以我们可以利用启动子探针载体在蓝藻中寻找更强的、可诱导的启动子, 并且设计更高效的双启动子穿梭表达载体。

1.2 复制子

第一次用于鱼腥藻 7120 转化体系的穿梭表达载体就含有复制子 pDU1 和大肠杆菌的复制子 pMB1。其中 pDU1 是念珠藻属 7524 的内源性质粒, 能在鱼腥藻 7120 中启动复制。此后, 人们构建的能在大肠杆菌和鱼腥藻 7120 之间穿梭表达的载体, 大部分都是在 Wolk 的研究组构建的载体的基础上衍变而来的^[29-30], 2007 年 Wolk 等人报道了 pDU1 中起复制作用的基因片段^[22]。

另外一个可以在蓝藻中进行复制的质粒是 RSF1010。它是一个 9.65 kb 的质粒, 能在革兰氏阴性菌中进行复制, 全基因序列的测定已完成^[31]。RSF1010 可以在单细胞蓝藻^[32]、鱼腥藻属^[33]、丝状蓝藻^[34]中进行复制。目前在鱼腥藻 7120 表达体系中表达外源基因的大部分穿梭表达载体所含的复制子主要是 pMB1 和 pDU1 这两个复制子。

1.3 选择标记基因

一个质粒克隆载体必须含有供选择克隆子的标记基因。一般转化大肠杆菌都是用 lacZ 作为选择标记基因进行蓝白筛选, 但由于蓝藻含有大量的藻蓝蛋白, 大多数蓝藻藻体本身始终是蓝色的, 所以不能用 lacZ 作为选择标记基因。多数蓝藻对 Cm、Ap、Tc、Sm、Km 等抗生素敏感, 因此迄今构建成的蓝藻穿梭载体大部分是嵌入抗生素抗性基因的重组质粒。在鱼腥藻 7120 转化体系中最常用的抗生素抗性基因有 Cm^r、Amp^r、Km^r、Sm^r、Sp^r、Neo^r 等。在所构建的鱼腥藻 7120 转化载体中, 有只含一个选择标记基因 (Cm^r 或 Neo^r) 的载体^[3,19]; 也有含两个选择标记基因的载体, 如 1993 年构建的 pRL278^[35] 含有新霉素抗性基因 (Neo^r) 和蔗糖敏感性基因 (Suc^s); 还有含 3 个选择标记基因的载体, 如 1998 年构建的 pKT-MT^[6] 含有 Cm^r、Amp^r、Sm^r 3 个抗生素抗性基因。

为检测外源基因的表达, 又相继构建了检测基因表达的质粒, 即在穿梭表达载体中插入报告基因, 如果聚糖合成酶 (sacB) 基因^[36]、荧光素酶 (lux) 基因^[13]、氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因^[37]、绿色荧光蛋白 (GFP)^[38] 等。选择标记基因的多样性将使鱼腥藻 7120 克隆子的筛选变得更便捷、更高效。

1.4 bom 位点

构建的穿梭载体要实现能在大肠杆菌和鱼腥藻 7120 之间进行移动转化就必须含有 bom 位点, 即转移作用位点。目前鱼腥藻 7120 的穿梭载体所含的 bom 位点都是源自于 pBR322^[3,39]。

1.5 限制酶切位点

早在 1983 年 Wolk 等人就提出了在鱼腥藻 7120 中存在 *Ava* I 和 *Ava* II 的同切酶, 这些酶会作用于质粒载体上相应的酶切位点, 从而降低转化效率^[3]。1997 年 Wolk 等人又发现鱼腥藻 7120 的第 3 个影响转化的酶即 *Ava* III 的同功酶^[40]。所以在构建鱼腥藻 7120 的穿梭载体时, 应注意把以上 3 个相应的酶切位点剔除掉或用甲基化对它们进行修饰, 从而保证转化成功。

1.6 其他载体研究

除了依靠穿梭载体, 人们还在试图寻找其他方法来转化蓝藻。海洋蓝藻噬菌体早在 1989 年就已报道, 1994 年又报道了分离到一种新的海洋蓝藻噬菌体并对其宿主范围进行了感染实验, 发现

Synechococcus NKBG 042902 对它十分敏感^[41]。有必要对海洋蓝藻噬菌体的转导机制进行研究,发展噬菌体载体系统,以期在特异性宿主蓝藻中获得外源基因表达,这也将为构建鱼腥藻 7120 转化体系载体提供新的思路。

还有另一方法就是构建整合载体。2008 年 Chaurasia 等成功构建整合载体^[42],因不需抗生素筛选,在环境安全方面有较好的优势。2009 年 Chaurasia 等通过基因整合载体研究了 groESL 操纵子对鱼腥藻 7120 的影响^[43]。一旦外源基因能整合到鱼腥藻 7120 的染色体上,外源基因将得到稳定、高效的表达,所以有必要对鱼腥藻 7120 的基因整合载体进行研究。

2 目的基因的修饰

载体研究对于鱼腥藻 7120 转化体系虽然很重要,但想要提高外源基因的表达效率,也不能忽视对目的基因的修饰。目前对目的基因的修饰主要集中于 SD 序列和遗传密码子修饰。

2.1 SD 序列

质粒载体在鱼腥藻中的表达效率还受到目的基因 SD 序列的影响。Takeshima 等 1994 年研究发现 SD 序列与起始密码 ATG 相距 6 个碱基时表达效率最高^[44],随着二者距离的增加,表达效率降低。施定基课题组做了较多的探索,发现不同的 SD 序列及其与起始密码之间的距离改变提高了 TNF- α 的表达效率^[20,45-46]。种种迹象表明在外源基因 5'端添加 SD 序列可以提高基因在鱼腥藻 7120 中的表达效率;在设计 SD 序列时应根据目的基因的特点寻找 SD 序列与起始密码子 ATG 的最佳距离。目前,对于表达效率提高得最大的就是通过改变 SD 序列,可使 TNF- α 在鱼腥藻 7120 中的表达效率从 0.27%提高到 3.30%^[20]。

2.2 遗传密码子

有人提出了鱼腥藻 7120 外源基因的表达还受到目的基因遗传密码子的影响。1990 年 Campbell 和 Gowri 指出在蓝藻中编码蛋白质的密码子同样存在偏好性^[47]。2005 年魏兰珍等人在不改变编码氨基酸的前提下按蓝藻中密码子偏好性将 GM₁ 藻株中成熟 hGM-CSF 基因 5'端的核苷酸序列中一些 G 和 C 改成 A 或 T^[4],结果使 hGM-CSF 在蓝藻中的表达提

高 136%。

3 宿主的研究

鱼腥藻 7120 是继集胞藻 6803 之后第 2 个完成全基因序列测定的蓝藻,相应的遗传背景和生理生化特点都已研究得比较透彻,这就有利于通过对鱼腥藻 7120 进行相应的诱变从而提高外源基因的表达效率。2001 年施定基等诱导鱼腥藻 7120 分化藻殖段,并以藻殖段为受体细胞表达人肿瘤坏死因子 α ,结果表明短藻丝体中外源基因的表达效率比正常的营养细胞提高 4-5 倍^[20,48-49]。在此之前,国内外对于如何提高外源基因在蓝藻中的表达效率都是在载体系统下功夫,这是第一次提出了通过改变受体细胞的生理状态来提高表达效率的,这为今后如何提高外源基因表达效率提出了另一条新思路。

此外,转基因鱼腥藻 7120 培养条件的优化也是必需的,这有利于提高外源基因的表达效率。培养基中的碳氮源、培养瓶规格、光暗周期、光质、光强、温度、CO₂ 等因素都会很大程度影响外源基因表达量^[50-52]。另外,生长激素^[53]、抗生素^[54]以及稀土元素^[55]的浓度也会影响外源基因表达效率。

4 转化方法的研究

到目前为止鱼腥藻 7120 转化体系主要是用接合转移系统来将携带有目的基因的载体转入宿主。接合转移是通过细胞间的接触介导的 DNA 转移。它涉及 3 种质粒,分别是运载质粒、辅助质粒和接合转移质粒。目前,用于接合转移的三方分别是:含有接合转移质粒的 *E. coli*;含有运载质粒和辅助质粒的 *E. coli* 以及作为受体的蓝藻细胞。该技术已经比较成熟,被广泛用于鱼腥藻 7120 的转化^[4-7]。

还有人用电击法作为鱼腥藻 7120 的基因转移系统。2004 年魏兰珍等人在报道蓝藻转移系统的选择与建立时就提到了他们已摸索了一套电击转移鱼腥藻 7120 的最佳转化条件^[56]。2008 年 Chaurasia 等构建的整合平台载体也是通过电击法转化的^[42]。这也将促进基因整合载体在鱼腥藻 7120 中的应用,从而使外源基因能稳定、高效的在宿主中表达。

5 应用

到目前为止,除了用于功能基因的研究外,鱼

腥藻 7120 用于外源基因表达已有许多成功案例, 显示了其巨大的应用潜力: 在医药和保健品方面有人肿瘤坏死因子(TNF- α)^[17]、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)^[4]、胸腺素(UB- α 1)、人表皮生长因子(hEGF)^[5]、人尿激酶原基因、人肝金属硫蛋白基因^[6]、人小肠三叶因子基因、人粒-巨噬细胞集落刺激因子基因(hGM-CSF)、二十碳五烯酸(EPA)、超氧化物歧化酶(SOD)等; 环境方面有蚊幼毒蛋白基因^[15]、脱氯基因^[57]、三羧酸循环中的果糖 1,6-二磷酸醛缩酶基因和丙糖磷酸异构酶基因^[58]; 农业上有水稻胞质 FBA 基因^[7]等。

6 结语

与大肠杆菌表达体系相比, 鱼腥藻 7120 具有以下优点: 能够进行光合自养生长, 培养条件简单, 成本低廉, 适于工业化生产; 蓝藻不形成包涵体, 这样可以减少下游的操作工艺, 节约成本; 不形成内毒素, 产品安全性好。但是到目前为止, 鱼腥藻 7120 转化体系的表达效率还是很低, 最多达到外源基因占总蛋白的 3%–5%, 远远没有大肠杆菌的表达效率高(30%–70%)。

除了研究载体, 可能诱变鱼腥藻 7120 形成有利于外源基因表达的突变体和摸索转基因蓝藻最佳生长条件和表达条件也是有希望的一条途径。自从鱼腥藻 7120 基因组全序列完成测序, 人们更加深入地对鱼腥藻 7120 的转录、蛋白组学和代谢方面进行着研究, 这也将推动鱼腥藻 7120 转化体系的研究。人们可以在蓝藻相关基因的研究中发现更强的、可诱导的启动子, 从而应用于该转化体系中, 进而提高该转化体系的表达效率。对鱼腥藻 7120 生理生化等作用机制的研究, 将推动人们去探索诱导分化更适合于表达外源基因的受体细胞。随着蓝藻分子遗传学和基因工程的发展, 有望克服鱼腥藻 7120 转化体系表达效率低的瓶颈问题, 从而发挥其在农业、污染控制和人类健康等方面应有的作用。

参考文献

- [1] Vioque A. Transformation of cyanobacteria. *Adv Exp Med Biol*, 2007(616): 12–22.
- [2] Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, *et al.* Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research*, 2001, **8**(5): 205–213.
- [3] Wolk CP, Vonshak A, Kehoe P, *et al.* Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(5): 1561–1565.
- [4] 魏兰珍, 王全喜, 施定基, 等. hGM—CSF 基因穿梭表达载体的构建及其在鱼腥藻 7120 中的克隆. *植物研究*, 2005, **25**(4): 436–440.
- [5] 戴激, 连慕兰, 施定基, 等. 人表皮生长因子(hEGF)基因在蓝藻中的表达. *植物学报*, 2001, **43**(12): 1260–1264.
- [6] 任黎, 邵强, 施定基, 等. 人肝金属硫蛋白-IA 基因在鱼腥藻中的克隆与表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, **14**(4): 365–371.
- [7] 冯燕, 王全喜, 施定基, 等. 水稻胞质 FBA 基因在鱼腥藻 7120 中的表达及其对光合作用的调控. *植物研究*, 2006, **26**(6): 691–698.
- [8] Haselkorn R, Rice D, Curtis SE, *et al.* Organization and transcription of genes important in *Anabaena* heterocyst differentiation. *Ann Microbiol*, 1983, **134B**(1): 181–193.
- [9] Bauer CC, Haselkorn R. Vectors for determining the differential expression of genes in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(11): 3332–3336.
- [10] Lopez-Gomollon S, Hernandez JA, Wolk CP, *et al.* Expression of *furA* is modulated by *NtcA* and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology*, 2007, **153**(Pt 1): 42–50.
- [11] Schmetterer G, Wolk CP, Elhai J. Expression of luciferases from *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* in filamentous cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 1986, **167**(1): 411–414.
- [12] Reddy AS, Nuccio ML, Gross LM, *et al.* Isolation of a delta 6-desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Molecular Biology*, 1993, **22**(2): 293–300.
- [13] Wolk CP, Cai Y, Panoff JM. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(12): 5355–5359.
- [14] Elhai J. Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Fems Microbiol Lett*, 1993, **114**(2): 179–184.
- [15] Wu XQ, Vennison SJ, Huirong L, *et al.* Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(12): 4971–4974.

- [16] 秦京东, 施定基, 徐旭东, 等. 在鱼腥藻 7120 中建立反义 glnA 系统. 植物生理学报, 1998, **24**(3): 225–232.
- [17] 刘凤龙, 张宏斌, 施定基, 等. 人肿瘤坏死因子- α 基因穿梭表达载体的构建和在鱼腥藻 7120 中的表达. 中国科学, 1999, **20**(2): 217–224.
- [18] 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. *Journal of Applied Phycology*, 2005, **17**(3): 273–280.
- [19] Lang JD, Haselkorn R. A vector for analysis of promoters in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(8): 2729–2731.
- [20] 李艳, 方瑾, 施定基. 人肿瘤坏死因子- α 在鱼腥藻 7120 中表达的调控. 北京师范大学硕士学位论文, 2001.
- [21] Desplancq D, Rinaldi AS, Horzer H, *et al.* Automated overexpression and isotopic labelling of biologically active oncoproteins in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, **51**(1): 53–61.
- [22] Wolk CP, Fan Q, Zhou R, *et al.* Paired cloning vectors for complementation of mutations in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Arch Microbiol*, 2007, **188**(6): 551–563.
- [23] Buikema WJ, Haselkorn R. Expression of the *Anabaena* hetR gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(5): 2729–2734.
- [24] Brusca JS, Chastain CJ, Golden JW. Expression of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 xisA gene from a heterologous promoter results in excision of the nifD element. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(7): 3925–3931.
- [25] El-Shehawy RM, Kleiner D. Effect of controlled expression of the hetR gene on heterocyst formation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Physiologia Plantarum*, 2003, **119**(1): 44–48.
- [26] Huang W, Wu QY. Identification of genes controlled by the manganese response regulator ManR in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(18): 1397–1401.
- [27] Dong YL, Xu XD. Outer membrane proteins induced by iron deficiency in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Progress in Natural Science*, 2009, **19**(2009): 1477–1483.
- [28] 魏兰珍, 谭玮, 王全喜. 启动子 PepcII 提高鱼腥藻 7120 中 hGM-CSF 基因表达效率的研究. 西北植物学报, 2008, **28**(1): 37–42.
- [29] Wolk CP, Cai YP, Cardemil L, *et al.* Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *Journal of Bacteriology*, 1988, **170**(3): 1239–1244.
- [30] Elhai J, Wolk CP. Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *The EMBO Journal*, 1990, **9**(10): 3379–3388.
- [31] Scholz P, Haring V, Wittmann-Liebold B, *et al.* Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*, 1989, **75**(2): 271–288.
- [32] Mermet-Bouvier P, Cassier-Chauvat C, Marraccini P, *et al.* Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Current Microbiology*, 1993, **27**(6): 323–327.
- [33] Thiel T. Genetic analysis of cyanobacteria. The molecular biology of cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994: 581–611.
- [34] Koksharova OA, Wolk CP. Genetic tools for cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**(2): 123–137.
- [35] Zhang CC. A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinases from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(24): 11840–11844.
- [36] Cai YP, Wolk CP. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(6): 3138–3145.
- [37] 徐旭东, 王业勤. 鱼腥藻—大肠杆菌 CAT 启动子控制载体的构建. 中国科学院研究生院学报, 1993, **10**(2): 203–209.
- [38] Asai H, Iwamori S, Kawai K, *et al.* Cyanobacterial cell lineage analysis of the spatiotemporal hetR expression profile during heterocyst pattern formation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *PLoS One*, 2009, **4**(10): e7371.
- [39] 楼士林, 章军, 吴巧娟, 等. 蓝藻基因表达载体系统的构建和应用. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, **40**(2): 586–590.
- [40] Elhai J, Vepritskiy A, Muro-Pastor AM, *et al.* Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(6): 1998–2005.
- [41] Sode K, Oozeki M, Asakawa K, *et al.* Isolation of a marine cyanophage infecting the marine unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* sp. NKBG042902. *J mar Biotech*, 1994(1): 189–192.
- [42] Chaurasia AK, Parasnis A, Apte SK. An integrative expression vector for strain improvement and environmental applications of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *J Microbiol Methods*, 2008, **73**(2): 133–141.
- [43] Chaurasia AK, Apte SK. Overexpression of the groESL operon enhances the heat and salinity stress tolerance of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain

- PCC7120. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(18): 6008–6012.
- [44] Takeshima Y, Takatsugu N, Sugiurat M, *et al.* High-level expression of human superoxide dismutase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(21): 9685–9689.
- [45] 戴激, 连慕兰, 施定基. 人表皮生长因子(hEGF)基因穿梭表达载体的构建和在蓝藻中的表达. 北京师范大学硕士论文, 2000.
- [46] 金锐, 王全喜, 施定基. hGM-CSF在鱼腥藻 7120 中的表达及其表达系统的改进. 上海师范大学硕士论文, 2006.
- [47] Campbell WH, Gowri G. Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. *Plant Physiol*, 1990, **92**(1): 1–11.
- [48] 欧阳叶新, 施定基, 胡鸿钧, 等. 几种因素诱导鱼腥藻 7120 短藻丝体的形成. 武汉植物学研究, 2001, **19**(5): 403–408.
- [49] 欧阳叶新, 施定基, 钟晖, 等. 高温和红光诱导的鱼腥藻 7120 短藻丝体中 TNF-A 基因表达效率的提高. 武汉植物学研究, 2003, **21**(4): 301–307.
- [50] 成静, 郑穗平, 郭勇. 环境因子对转基因鱼腥藻 7120 生长的影响. 华南理工大学学报(自然科学版), 2000, **28**(10): 5–10.
- [51] 张晨, 刘志伟, 郭勇. CO₂ 对转基因鱼腥藻生长的影响. 生物技术, 2003, **13**(4): 27–29.
- [52] 欧阳叶新, 施定基, 梁承邺, 等. 转基因鱼腥藻 7120 适宜生长条件的初步研究. 武汉植物学研究, 2003, **21**(5): 406–410.
- [53] 刘志伟, 张晨, 侯雨文, 等. 植物生长调节剂对转基因鱼腥藻 7120 生长与外源基因表达的影响. 植物生理学通讯, 2004, **40**(5): 567–569.
- [54] 刘志伟, 张晨, 郭勇. 转 TNF- α 基因鱼腥藻 7120 质粒稳定性研究. 生物技术, 2004, **14**(2): 11–13.
- [55] 刘志伟, 张晨, 郭勇. 镧对转基因鱼腥藻生长和外源基因表达的影响. 稀土, 2004, **25**(5): 30–32.
- [56] 魏兰珍, 马为民, 王全喜, 等. 蓝藻基因转移系统的选择与建立. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(1): 18–22.
- [57] Kuritz T, Wolk CP. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(1): 234–238.
- [58] 马为民, 王全喜, 施定基. FBPase、ALD 和 TPI 的蓝藻基因工程及其对光合作用的调控. 上海师范大学硕士论文, 2003.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。