

文章编号: 1674 - 5566(2013)05 - 0665 - 07

“细菌型”*pepc2* 基因反向表达载体构建及在莱茵衣藻中的表达

田琪琳¹, 施定基^{1,2}, 贾晓会¹, 米华玲³, 黄希文¹, 何培民¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093; 3. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, EC 4.1.1.31) 在植物碳代谢中处于代谢纽的关键位置, 是调节细胞蛋白质和脂肪酸含量的关键酶, 通过抑制 *pepc* 基因的表达, 可以提高细胞的含油率。通过克隆莱茵衣藻“细菌型”*pepc2* 基因的部分序列 (简称 *Crpepc2*) 和莱茵衣藻融合启动子 Hsp70A-RBCS2 (简称 HR), 将 HR 和 *Crpepc2* 片段插入 pSP124s 中, 获得 *Crpepc2* 反向表达的莱茵衣藻高效表达载体 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*。利用基因枪将 pSP24s 和 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* 分别转入莱茵衣藻 cc-503 藻株, 得到空质粒型和反向型突变藻株。利用 qPCR 检测莱茵衣藻野生型、空质粒型和反向型藻株“细菌型”*pepc2* 基因的相对表达量, 结果表明空质粒的导入对莱茵衣藻 *pepc2* 基因的相对表达量影响很小, 为野生型的 92.95%; 而反向型 *pepc2* 基因的导入明显降低了莱茵衣藻 *pepc2* 基因的相对表达量, 仅为野生型的 2.94%。该结果一方面说明我们建立了利用 qPCR 快速检测莱茵衣藻 *pepc2* 基因相对表达量的方法, 另一方面也证明利用 *Crpepc2* 反向表达的方法 (即“反向载体技术”) 可以有效的抑制莱茵衣藻 *pepc2* 基因的表达, 为进一步筛选稳定的含油量高的藻株奠定了良好的基础。

研究亮点: 利用“反向载体技术”, 构建莱茵衣藻 *pepc2* 基因的反向高效表达载体, 利用基因枪法将其转入莱茵衣藻, 获得 *pepc2* 基因表达量明显降低的转基因突变株, 并建立了利用 qPCR 检测莱茵衣藻 *pepc2* 基因相对表达量的方法, 为进一步筛选高含油量的基因工程微藻提供基础材料。
关键词: 莱茵衣藻; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; qPCR; 反向载体技术; 生物柴油
中图分类号: Q 785
文献标志码: A

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 是一种胞质酶, 催化 3 碳的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 进行不可逆羧化作用, 形成 4 碳的草酰乙酸 (OAA)^[1-2]。近年来, 随着对植物和细菌 PEPC 酶的深入研究, 发现抑制 PEPC 酶的表达可以使植物的含油量得到明显的提高。这主要是由于 PEPC 酶在 C 代谢中处于核心地位^[3], 它催化 PEP 形成的草酰乙酸能进一步合成氨基酸或者蛋白质。但在 PEPC 酶受到抑制的情况下, PEP 就会朝着油脂积累的方向合成^[4-5]。因此在光合效率较高时, 通过改变 PEPC 酶的表达就可以改变碳代谢向蛋白质或脂类的流向。侯李君等通过调节大肠杆菌 PEPC 酶的表达, 已经获得了含

油量提高 46.9% 的基因工程菌株^[4]。而微藻具有生长速率高, 不占土地, 不影响人类食物需求等油料作物所不具有的优势^[5], 如果能利用基因工程的手段培养出高产油的微藻生产生物柴油, 将能够缓解当今社会面临的能源危机, 具有很重大的社会意义。

在微藻的研究中, 绿藻由于含油量高, 生长快, 成为开发生物柴油极受关注的藻种。莱茵衣藻是一种单细胞的绿藻, 在 2007 年就已完成了全基因组的测序^[6], 对其遗传和转化的机制研究得比较清楚。莱茵衣藻中共发现两种 PEPC 酶^[7-8], 在 2005 年, MAMEDOV 等对构成这两种 PEPC 酶蛋白的亚基进行分析, 发现莱茵衣藻具

收稿日期: 2013-04-15

修回日期: 2013-06-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2009AA064401); 上海市科学技术委员会项目 (12391901700)

作者简介: 田琪琳 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为油藻转基因。E-mail: waichifanqie@126.com

通信作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

有两种 *pepc* 基因,一种为“植物型”,简称 *pepc1*,一种为“细菌型”,简称 *pepc2*,*pepc1* 的结构与大多数高等植物的 *pepc* 基因同源性较近;而对 *pepc2* 基因结构和功能的了解还不是很清楚^[9]。在 2010 年,MAMEDOV 等进一步研究发现“细菌型”的 PEPC 酶在结构上比“植物型”的 PEPC 酶复杂,并且催化活性更强^[10]。

莱茵衣藻外源基因的表达效率与启动子等元件有密切的关系,莱茵衣藻 RBCS2 是 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)小亚基的启动子,属于莱茵衣藻内源性的启动子,表达效率较高。LUMBRERAS 等通过在 RBCS2 中插入内含子并删去部分上游片段的方法,显著提高了外源基因的表达效率^[11-12],而 SCHRODA 等通过在 RBCS2 上游区域融合 Hsp70A 启动子,不但进一步提高了外源基因的表达效率,还减少了基因沉默的现象^[13-14]。

因此本实验克隆了莱茵衣藻的“细菌型”*pepc* 基因的部分序列(*Crpepc2*)和莱茵衣藻 Hsp70A-RBCS2 融合启动子,构建 *Crpepc2* 基因反向表达的莱茵衣藻高效表达载体,利用基因枪法转入莱茵衣藻中,获得 *pepc2* 基因表达下调的藻株,一方面证明利用 *Crpepc2* 反向表达的方法(即“反向载体技术”)可以有效地抑制 *pepc2* 基因的表达,另一方面为进一步筛选稳定的含油量高的藻株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种和质粒

莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (FACHB-479)购自中国水产科学院水生生物研究所;莱茵衣藻 cc-503 缺壁突变株和莱茵衣藻高效表达载体 pCB740 购自美国杜克大学;莱茵衣藻表达载体 pSP124s 由上海师范大学藻类学实验室赠送。

1.1.2 试剂与仪器

限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Pac* I 购自 NEB 生物公司;*Bam*H I、T4 连接酶和反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;荧光定量预混试剂(SYBR Green)购自天根生化科技(北京)有限公司;摇床 TZ-10 型购自上海博彩生物科技有限公司;荧光定量 PCR 仪 FTC-3000 购自枫岭生物

技术有限公司;基因枪(Bio-Rad PDS 1000/He)由中科院植物生理生态研究所提供使用。

1.2 实验方法

1.2.1 莱茵衣藻 *pepc2* 基因和 Hsp70A-RBCS2 启动子的克隆

莱茵衣藻培养于 TAP 液体培养基(pH 7.5)^[15]中,温度 26 °C,光照 25 μmol/(m²·s),振荡频率 135 r/min。收集对数中期的莱茵衣藻 FACHB-479(OD₇₅₀达到 1.2 左右)。液氮研磨后,利用 trizol 法抽提得到莱茵衣藻的总 RNA;用反转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA。根据 NCBI 上刊登的莱茵衣藻 *pepc2* mRNA 序列(AY517643),设计引物 P1(CG ATGCTCGGTAGC CTGCTTGACG)和 P2(TAG GGTACCACAACCGACT GCTCCACA),下划线分别代表起始位点 ATG 和酶切位点 *Kpn* I。以莱茵衣藻 cDNA 为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 10 μL 2 × EasyTaq SuperMix,P1 和 P2 各 1 μL,1 μL 莱茵衣藻 cDNA,7 μL ddH₂O。反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 60 s,32 个循环;72 °C 延伸 5 min。将 PCR 得到的 *Crpepc2* 片段连接到质粒 pMD18-T 上,构建克隆载体 pMD18-T-*Crpepc2*,并送至上海生工进行测序。

根据莱茵衣藻高效表达载体 pCB740 的序列以及含有的 Hsp70A-RBCS2 启动子的位点,设计引物 P3(GGC TTAATTAA GGATCCAGTATAGG)和 P4(TGT GGTACCTCTCTGTAAAA AAGT),下划线分别代表酶切位点 *Pac* I 和 *Kpn* I,扩增莱茵衣藻高效启动子 Hsp70A-RBCS2。PCR 反应体系为 10 μL 2 × EasyTaq SuperMix,P3 和 P4 各 1 μL,1 μL 模板(pCB740),7 μL ddH₂O。反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 50 s,58 °C 50 s,72 °C 30 s,32 个循环;72 °C 延伸 5 min。将 PCR 得到的 Hsp70A-RBCS2 序列(以下简称 HR)接到质粒 pMD18-T 上,构建克隆载体 pMD18-T-HR,并送至上海生工进行测序。

1.2.2 *Crpepc2* 基因反向高效表达载体的构建

在含有博来霉素抗性基因的莱茵衣藻表达载体 pSP124s 的基础上构建 *Crpepc2* 基因反向插入的高效表达载体 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*,具体构建过程见结果 2.2,载体构建过程中的酶切、连接、筛选操作按《分子克隆实验指南》的方法进行^[16]。

1.2.3 基因枪转化莱茵衣藻及抗生素筛选

受体细胞制备:收集 20 mL 对数生长中期的莱茵衣藻 cc-503 缺壁突变株,4 000 r/min 离心 5 min。去上清,加入 1 mL 新鲜培养液悬浮沉淀,135 r/min 下振荡 4 h,取 200 μ L 藻液涂于 TAP 固体培养平板中央,置于培养箱中培养 3~4 d,温度为 26 $^{\circ}$ C,光照为 25 μ mol/($m^2 \cdot s$)。

制备包裹 DNA 的金粉颗粒:金粉(约 3 mg)置于无水乙醇中保存,使用时吸去无水乙醇;加入 1 mL 无菌水,振荡重悬,10 000 r/min 离心 10 s,共重复 3 次;加入 50 μ L 无菌水,振荡混匀后,依次加入 15 μ g DNA(分别为 pSP124s 和 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*)、50 μ L $CaCl_2$ (2.5 mol/L)、20 μ L 亚精胺(0.1 mol/L),每加一种振荡 10 s,加完后再振荡 3 min;4 $^{\circ}$ C 放置 10 min;10 000 r/min 离心 10 s,弃上清;用 250 μ L 无水乙醇洗涤包被的金粉颗粒,10 000 r/min 离心 10 s,弃上清,重复 1 次;10 μ L 无水乙醇重悬金粉,供轰击使用。

基因枪轰击:整个轰击过程在超净台中进行。所用的耗材均用 75% 乙醇擦拭或高温消毒。取 10 μ L 制备好的包裹 DNA 的金粉,点于 DNA 载片的中心位置,于超净工作台中吹干,以备轰击使用。轰击参数:样品室真空度为 27 英寸汞柱,压强为 1 100 Pa;轰击距离为 6 cm。

轰击后将平板置于培养箱中弱光培养 3 d 后,用新鲜培养基将细胞从培养皿中洗脱下来,重新涂于含抗生素(5 μ g/mL)的培养皿中培养,并逐步提高抗生素浓度至 30 μ g/mL。挑取单菌落进行液体培养。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 *pepc2* 基因的相对表达量

收集对数后期的野生型、空质粒型(转 pSP124s)和反向型(转 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*)莱茵衣藻(OD_{750} 达到 1.4 左右)。液氮研磨后,利用 trizol 法抽提得到莱茵衣藻的总 RNA;用反转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA。内参基因 18 S 的引物为 P5(TCAACTTTCGATGGTAGGATAGTG)和 P6(CCGTGTTCAGGATTGGGTAATTT)^[17]。根据 NCBI 上刊登的莱茵衣藻 *pepc2* mRNA 序列(AY517643),设计莱茵衣藻“细菌型”*pepc2* 基因的 qPCR 引物 P7(AGCGGGTAAGGCAAGTGG)和 P8(CGGAAGGCAGTCAGGAA)。

分别以野生型,空质粒型和反向型突变体莱茵衣藻的 cDNA 为模板,进行荧光定量 PCR 反应。反应体系为 20 μ L,包含 10 μ L SuperReal PreMix Plus,上游引物和下游引物各 0.6 μ L,1 μ L cDNA,0.5 μ L 50 \times ROX Reference Dye,7.3 μ L ddH₂O。在荧光定量 PCR 仪上完成反应,条件为:95 $^{\circ}$ C 15 min,94 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,在 72 $^{\circ}$ C 收集荧光,共 40 个循环。

2 结果

2.1 莱茵衣藻 *Crpepc2* 基因与 hsp70A-RBCS2 启动子克隆

Crpepc2 基因片段 PCR 扩增产物大小为 639 bp(图 1a),与 pMD18-T 相连后,得到中间载体 pMD18-T-*Crpepc2*,经测序并与 GenBank 比较,其序列与莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)“细菌型”*pepc2* 基因(AY517643)相似度为 99%,证明该产物即为莱茵衣藻 *Crpepc2* 基因片段。HR 启动子 PCR 扩增产物大小为 532 bp(图 1b),与 pMD18-T 相连后,得到中间载体 pMD18-T-HR,经测序并与 pCB740 载体的序列进行 BLAST 比对,HR 启动子序列同源性达到 99%,证明该产物即为 HSP70A-RBCS2 启动子。

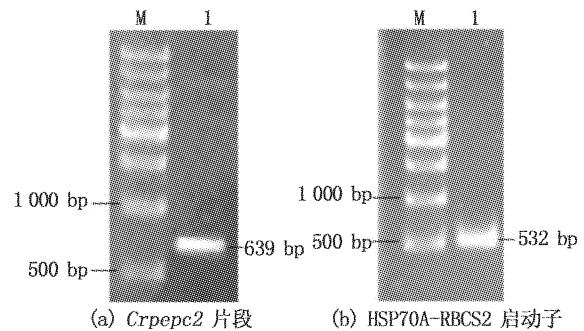


图 1 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR amplification of *Crpepc2* fragment

2.2 *Crpepc2* 基因反向高效表达载体构建

Crpepc2 基因反向高效表达载体(pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*)构建图谱见图 2。用 *Pac* I 和 *Kpn* I 双酶切 pMD18-T-HR 和 pSP124s 载体,回收切下的目的片段 HR 和 pSP124s 载体大片段,用 T4 连接酶连接这两个片段,转化大肠杆菌 DH5 α ,氨苄青霉素筛选阳性克隆,提取质粒,进行 PCR 扩增鉴定基因的插入(图 3),经验证获得 pSP124s-HR 载体。

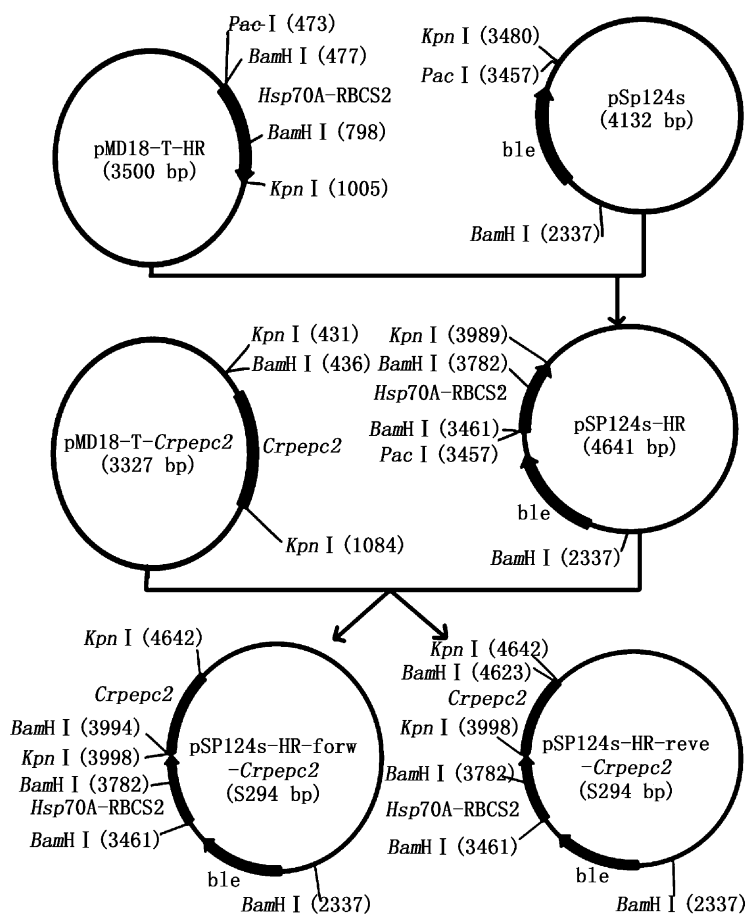


图2 *Crpepc2* 基因反向高效表达载体 (pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*) 构建图谱
Fig. 2 Construction of the reverse recombinant vectors pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*

用 *Kpn* I 分别单酶切 pMD18-T-*Crpepc2* 和 pSP124s-HR 载体, 分别切下目的片段 *Crpepc2* 和线性的 pSP124s-HR 载体大片段, 用 T4 连接酶连接这两个片段, 转化大肠杆菌 DH5 α , 氨苄青霉素筛选阳性克隆, 提取质粒, 进行 PCR 扩增和酶切鉴定基因的插入 (图 4a) 及插入方向。 *Kpn* I 单酶切并连接后会出现正反向连接两种情况: 一种为 *Crpepc2* 正向连接的载体 pSP124s-HR-forw-*Crpepc2*; 一种为 *Crpepc2* 反向连接的载体 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*。因此将 PCR 扩增呈阳性的载体进行 *Bam*H I 酶切, 鉴定插入方向, 反向插入的载体酶切结果为 321 bp, 841 bp, 1 124 bp 和 3 008 bp 4 条片段, 正向插入的载体酶切结果为 321 bp, 212 bp, 1 124 bp 和 3 637 bp 4 条片段 (图 4b)。

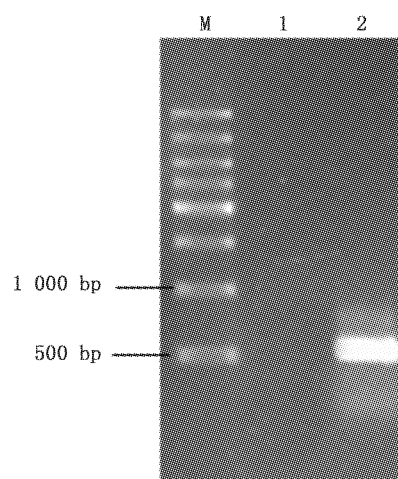


图3 pSP124s-HR 的 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR identification of pSP124s-HR
M 为 500 bp Ladder; 1. 阴性对照 (pSP124s); 2. 重组载体 (pSP124s-HR)。

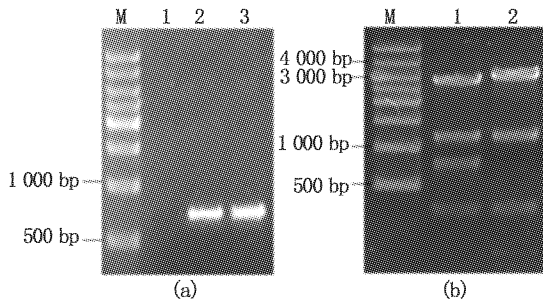


图4 载体 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* 的 PCR 扩增和酶切鉴定

Fig.4 PCR identification and restriction identification of pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*

a. *Crpepc2* 基因的 PCR 鉴定结果 [1. 阴性对照 (pSP124sp-HR), 2 和 3 均为重组载体 (pSP124s-HR-*Crpepc2*)]; b. *Bam*H I 酶切结果 (1. pSP124s-HR-reve-*Crpepc2*, 2. pSP124s-HR-forw-*Crpepc2*); M 均为 500 bp Ladder。

2.3 基因枪转化莱茵衣藻及抗生素筛选

利用基因枪法分别将 pSP124s (空质粒) 和 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* (反向型) 转化成莱茵衣藻 cc-503, 利用含抗生素 Zeocin 的固体培养基筛选阳性转化藻株, 并逐步提高抗生素浓度至 30 μ g/mL (图版), 共筛选到 21 株空质粒型和 28 株反向型抗抗生素阳性转化藻株。而野生型不具有抗抗生素能力, 藻体逐步死亡。

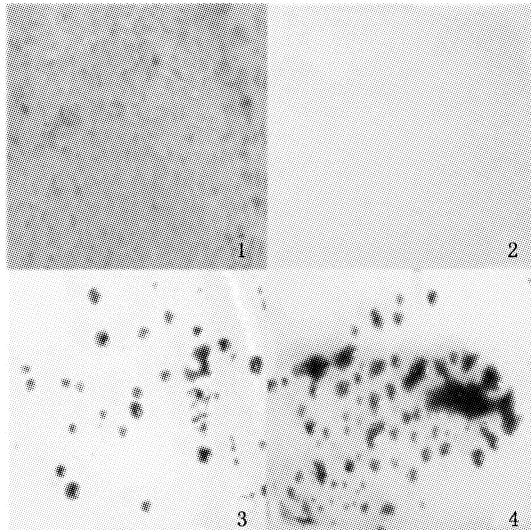


图5 液体培养基筛选突变体莱茵衣藻

Fig.5 Screening mutant in liquid medium

a. 野生型莱茵衣藻 (不含抗生素); b. 野生型莱茵衣藻 (5 μ g/mL Zeocin); c. 空质粒莱茵衣藻 (5 μ g/mL Zeocin); d. 反向型莱茵衣藻 (5 μ g/mL Zeocin)。

2.4 qPCR 检测 *Crpepc2* 基因的相对表达量

以莱茵衣藻 18 S 为内参基因, 利用 qPCR 检测野生型和突变体莱茵衣藻 *pepc2* 基因的相对表达量 (图 6), 空质粒型的表达量略低于野生型, 为野生型的 0.93 倍, 反向型的 *pepc2* 基因表达量非常低, 仅为野生型的 0.029 倍 (约为 1/35)。

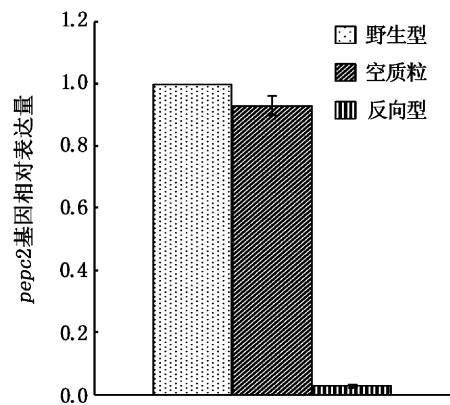


图6 野生型和突变体莱茵衣藻“细菌型”*pepc2* 基因的相对表达量

Fig.6 The relative expression of “bacterial-type” *pepc2* in wild type and mutant strains in *C. reinhardtii*

图版 固体培养基筛选突变体莱茵衣藻

Plate Screening mutant in solid medium

1. 野生型莱茵衣藻 (不含抗生素); 2. 野生型莱茵衣藻 (30 μ g/mL Zeocin); 3. 空质粒型莱茵衣藻 (30 μ g/mL Zeocin); 4. 反向型莱茵衣藻 (30 μ g/mL Zeocin)。

3 讨论

莱茵衣藻对 Zeocin 抗生素具有较高的敏感性。

曹军平曾报道了莱茵衣藻抗生素敏感性研究结果,在液体培养基中 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 就可以抑制莱茵衣藻的生长,在固体培养基中 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 就可以抑制莱茵衣藻的生长^[18]。该研究与曹军平实验结果一样,野生型不能在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 固体培养基和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 液体培养基中存活。而本实验采用的空载体 pSP124s 及新构建的载体 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* 均含有抗 Zeocin 基因,可以分解 Zeocin 抗生素,因此,转基因 pSP124s 空质粒型及 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* (反向型)藻株均有抗抗生素作用,并可以在 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin 的固体培养基及 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的液体培养基中生长,说明 pSP124s 和 pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* 均成功导入到莱茵衣藻中。

由于莱茵衣藻本身含有 *pepc2* 基因,因此难以用普通 PCR 的方法检测基因是否整合进莱茵衣藻细胞中。本实验建立了用荧光定量 PCR 检测野生型和两种突变体莱茵衣藻的 *pepc2* 基因的相对表达量的方法,同时也验证了反向 *Crpepc2* 片段已经进入莱茵衣藻中,并得到了正确转录。qPCR 的结果表明,反向型突变体莱茵衣藻的 *pepc2* 基因的表达仅为野生型的 2.94%,空质粒型的表达量为野生型的 93%,说明 pSP124s 的导入并未对莱茵衣藻 *pepc2* 基因的表达产生明显影响,而真正产生影响的为反向表达的 *Crpepc2* 片段。产生这种现象的原因一方面是由于反向插入的 *pepc* 基因在转录时能够特异地与相应的 mRNA 分子结合,从而抑制该 mRNA 的合成与翻译。另一方面可能是由于本实验克隆的 *Crpepc2* 片段中含有一段 PEPC 酶的保守区域 (VITAHPTQalRR) 和催化活性位点 (H),抑制这段序列的表达,会对莱茵衣藻 *pepc2* 基因的表达产生很大的影响。

本实验验证了“反向载体法”下调 *pepc2* 基因表达的可行性,并且只需用 *pepc2* 基因全序列的 13.4% (约 1/7) 就可产生明显的抑制效果。根据我们对 *Crpepc2* 转入大肠杆菌进行功能分析的结果表明,莱茵衣藻“细菌型”*pepc2* 基因具有调节蛋白质和脂肪酸的含量的功能,因此,本实验获得的 *pepc2* 基因抑制表达的莱茵衣藻突变株,为进一步筛选得到稳定的含油量高的藻株奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] IZUI K, MATSUMURA H, FURUMOTO T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology [J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55 : 69 - 84.
- [2] ETTEMA T J, MAKAROVA K S, JELLEMA G L, et al. Identification and functional verification of archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in archaeal central carbohydrate metabolism [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186 (22) : 7754 - 7762.
- [3] RAGHAVENDRA A S, SAGE R F. C4 photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms [M]. Springer Science + Business Media, 2011 : 32.
- [4] 侯李君, 施定基, 蔡泽富, 等. 蓝藻正反义 *pepcA* 基因导入对大肠杆菌中脂类合成的调控 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28 (5) : 52 - 58.
- [5] 宋东辉, 侯李君, 施定基. 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用 [J]. 生物工程学报, 2008, 24 (3) : 341 - 348.
- [6] MERCHANT S S, PROCHNIK S E, VALLON O, et al. The chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions [J]. Science, 2007, 318 (5848) : 245 - 250.
- [7] CHEN J H, JONES R F. Multiple forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1970, 214 (2) : 318 - 325.
- [8] RIVOAL J, PLAXTON W C, TURPIN D H. Purification and characterization of high- and low-molecular-mass isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Kinetic, structural and immunological evidence that the green algal enzyme is distinct from the prokaryotic and higher plant enzymes [J]. Biochemical Journal, 1998, 331 : 201 - 209.
- [9] MAMEDOV T G, MOELLERING E R, CHOLLET R. Identification and expression analysis of two inorganic C- and N-responsive genes encoding novel and distinct molecular forms of eukaryotic phosphoenolpyruvate carboxylase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. The Plant Journal, 2005, 42 (6) : 832 - 843.
- [10] MAMEDOV T G, CHOLLET R. Discovery of novel Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC) genes and their active polypeptides in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Proceedings of ANAS (Biological Sciences), 2010, 65 (5/6) : 99 - 105.
- [11] LUMBRERAS V, PURTON S. Recent advances in *Chlamydomonas transgenics* [J]. Protist, 1998, 149 (1) : 23 - 27.
- [12] LUMBRERAS V, STEVENS D R, PURTON S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron [J]. The Plant Journal, 1998, 14 (4) : 441 - 447.

- [13] SCHRODA M, BLÖCKER D, BECK C F. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas* [J]. *The Plant Journal*, 2000, 21 (2): 121 - 131.
- [14] SCHRODA M, BECK C F, VALLON O. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas* [J]. *The Plant Journal*, 2002, 31(4): 445 - 455.
- [15] HARRIS E H, STEM D B, WITMAN G. The *Chlamydomonas* sourcebook [M]. Cambridge University Press, 1989.
- [16] 萨姆布鲁克, 黄培堂. 分子克隆实验指南(上下册) [M]. 北京:科学出版社, 2005.
- [17] LI Y, DENG X, YANG J, et al. A putative protein kinase Femu9p contributes to the iron deficiency-inducible expression of FOX1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, 6(12): 1724 - 1731.
- [18] 曹军平. 莱茵衣藻外源基因高效转化系统的建立及金藻转化方法的研究 [D]. 北京:中国农业科学院, 2000.

The expression of recombinant vector of reverse “bacterial-type” *pepc2* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*

TIAN Qi-lin¹, SHI Ding-ji^{1,2}, JIA Xiao-hui¹, MI Hua-ling³, HUANG Xi-wen¹, HE Pei-min¹

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 3. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4. 1. 1. 31) is located at the key site of plant carbon metabolism pathways which can regulate the protein content and the lipid content in cell, and the down-regulation of PEPC expression caused increased lipid accumulation. In this study, we cloned the fragment of the “bacterial-type” *pepc2* gene from *Chlamydomonas reinhardtii* (named *Crpepc2*) and the Hsp70A-RBCS2 promoter (named HR), inserted the HR and *Crpepc2* into pSP124s vector, then the reverse recombinant vector pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* was obtained. The pSP124s and pSP124s-HR-reve-*Crpepc2* vector were transformed into *C. reinhardtii* cc-503 strain through biolistic, respectively, the blank strain and reverse strain were obtained. The relative expression of *pepc2* gene was measured in wild strain, blank strain and reverse strain by using qPCR. The data showed that the pSP24s in the blank strain didn't obviously influence the relative expression of *pepc2* gene, which was 92.95% of that of the wild strain, and the reve-*Crpepc2* in the reverse strain significantly inhibited the relative expression of *pepc2* gene, which was only 2.94% of that of the wild strain. This result indicated that we have established the method to detect the relative expression of *pepc2* gene in *C. reinhardtii* by using qPCR, and it also proved that “reverse vector method (RVM)” could effectively inhibit the expression of *pepc2* gene in *C. reinhardtii*. These findings may lay a good foundation for screening high-lipid content reverse strain.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; phosphoenolpyruvate carboxylase; qPCR; reverse vector method (RVM); biodiesel