

雨生红球藻 β -胡萝卜素酮化酶基因在莱茵衣藻叶绿体中的表达

檀琮萍^{1,2}, 阎斌伦³, 梁成伟^{1,2}, 苏忠亮⁴, 秦松¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039; 3. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 4. 青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266042)

摘要: 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 的 β -胡萝卜素酮化酶是虾青素生物合成途径中关键酶之一, 本研究通过基因枪法将克隆出的 β -胡萝卜素酮化酶基因 (*bkt*), 转入莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的叶绿体中, 经过含 100 mg/L 壮观霉素固体培养基筛选得到转化子。通过 PCR 和基因组酶切 Southern 杂交分析, 证明 *bkt* 基因通过同源重组定点整合到转化子的叶绿体基因组中。进一步通过 RT-PCR 和 RT-PCR Southern 杂交分析, 表明 *bkt* 在衣藻转化子中得到表达。

关键词: 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*); 叶绿体转化; β -胡萝卜素酮化酶基因 (*bkt*)

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007)11-0067-06

虾青素 (Astaxanthin, 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β' -胡萝卜素, $C_{40}H_{52}O_4$) 是一种氧化型类胡萝卜素。虾青素特殊的分子结构使它比一般类胡萝卜素具有更强的抗氧化活性^[1-3], 并且具有提高动物的免疫能力及预防癌症的作用^[4,5]。目前虾青素主要用作鱼类 (鲑鱼、鲟鱼、虹鳟鱼、真鲷等) 和虾蟹等甲壳类动物及家禽的饲料添加剂^[6,7]。天然虾青素已被批准为安全的人类食品添加剂, 以用于食品的着色、保鲜及营养^[8]。此外, 虾青素在药品、化妆品和营养保健品等产业也具有潜在的应用市场。当前虾青素天然生物来源相当有限, 因此, 利用生物技术来生产虾青素已成为虾青素生产研究的一项重要课题。

目前, 通过基因重组技术将来自于欧文氏菌 (*Erwinia uredovora*) 的合成 β -胡萝卜素相关基因簇和来自于橙黄土壤杆菌 (*Agrobacterium aurantiacum*) 的 β -胡萝卜素酮化酶基因 (*crtW*) 及羟化酶基因 (*crtZ*) 转入大肠杆菌和酵母 (*Candida utilis*), 以生产虾青素, 但是转化子合成虾青素的含量低 (干质量比不超过 0.5 mg/g)^[9,10]。通过基因工程手段改变烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的类胡萝卜素合成途径以合成虾青素的研究也在开展^[11], 但是高等植物存在

生命周期长, 以及基因逃逸带来的安全性等问题。

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是单细胞绿藻, 具有培养简单、生长快速等特点。莱茵衣藻的叶绿体内具有虾青素合成的底物 β -胡萝卜素。提取、纯化藻内积累的虾青素方便、成本低, 并且衣藻可以封闭式培养, 避免转基因生物安全性问题。 β -胡萝卜素酮化酶和 β -胡萝卜素羟化酶是将 β -胡萝卜素转变成虾青素的两个关键酶^[12,13]。到目前为止, 还未见衣藻类胡萝卜素代谢工程研究的报道。本研究将雨生红球藻的 β -胡萝卜素酮化酶基因 (*bkt*), 通过基因枪法转入衣藻叶绿体中, 经过 PCR、基因组酶切 Southern 杂交分析, 表明外源基因整合到叶绿体基因组中。通过 RT-PCR 及 RT-PCR Southern 杂交分析, 外源基因得到表达。本研究建立了叶绿体转化体系, 并且为表达另外一个酶 (β -胡萝卜素羟化酶), 以期

收稿日期: 2006-05-06; 修回日期: 2006-08-26

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目 (KZCXZ-YW-209)

作者简介: 檀琮萍 (1974-), 女, 安徽贵池人, 在读博士, 研究方向: 功能基因高效表达, E-mail: tcpczz@yahoo.com.cn; 秦松, 通讯作者, 电话: 0532-82898500, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

在衣藻内积累虾青素奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻株和载体

雨生红球藻由中国科学院海洋研究所刘建国研究员馈赠, 采用 MCM 培养基培养^[14]; 野生型衣藻 137cc 由浙江大学生命学院钱凯先教授馈赠, 采用 TAP 培养基培养^[15]。p64Dbkt 衣藻叶绿体表达载体, 含有衣藻叶绿体同源片段 *clpP-trnL-petB* 及 *chlL* 基因并克隆有 *aptA-aadA-rbcL* 表达盒和 *aptA-bkt-rbcL* 表达盒, 由本实验室构建; 大肠杆菌 Top10 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 为 Qiagen 公司产品; 反转录酶 MMLV RNase H 为 Promega 公司产品; 限制性内切酶、pyrobest Taq DNA 聚合酶和 RNase-free DNase I 为 TaKaRa 公司产品; 壮观霉素购自 Sigma 公司; 地高辛 DNA 标记和检测试剂盒购自 Roche 生物有限公司。

1.1.3 引物

根据 Kajiwara^[12]1995 年报道的雨生红球藻 *bkt* 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: D45885), 设计 *bkt* 上下游引物; 根据 *aadA* 基因序列 (GenBank 登录号: AAR14532) 和衣藻叶绿体 *chlL* 基因序列 (GenBank 登录号: BK000554) 设计 PCR 引物, 鉴定转化子。引物由上海生工生物工程公司合成。引物的序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primers sequence

引物名称	序列 (5'-3')
bkt1	CACGGATCCCAGAATGCACGTCGCATCG
bkt2	CGGTCGACCCCGGGGGACCAGGTCATGCCAA
aadA1	ATGGCAGAAGCGGTGATCGCCGAA
aadA2	ATTTGCCGACTACCTT
chlL1	AAAAGGTTTGCCGAACAATG

1.2 方法

1.2.1 莱茵衣藻叶绿体转化

收集 15 mL 处于对数生长后期的莱茵衣藻细胞, 涂于 TAP 固体平板中央直径大约 5 cm。于 20 ℃, 光照强度 1 500 lx, 光/暗周期 12 h/12 h 培养 1~2 d。参照 Kindle^[16]的方法, 在轰击压力 1 100 Pa 和轰击距离 6 cm 条件下, 进行基因枪转化, 同时用不加质粒 DNA 的金粉轰击衣藻细胞作为对照。轰击后的衣藻平皿置于光照条件 150 lx 的弱光下培养 24 h。然后用 1 mL 无菌 TAP 培养基洗下, 涂布于含 100 mg/L 壮观霉素的固体选择培养基上进行筛选。

1.2.2 PCR 扩增鉴定转化子

提取对壮观霉素具有抗性的莱茵衣藻基因组总 DNA, 具体提取方法按照文献[17]。以总 DNA 为模板, 采用 bkt 和 aadA 两对引物, 进行 PCR 扩增。为了进一步鉴定 *bkt* 基因通过同源重组定点整合到衣藻叶绿体基因组中, 采用一对引物上游设计在叶绿体片段 *chlL* 基因 5'端, 下游引物与 *bkt* 基因 3'端互补 (*bkt2*), 进行 PCR 扩增。

1.2.3 基因组酶切 Southern blot 分析

提取 PCR 鉴定含有 *aadA* 和 *bkt* 这两个表达盒的衣藻转化子基因组总 DNA。将总 DNA 进行 *EcoR* V 和 *Sac* I 双酶切, 37 ℃, 4~5 h。将酶切后的样品进行琼脂糖电泳, 采用电转移法转膜, 然后与地高辛标记的 *bkt* 基因探针进行杂交。*bkt* 基因探针的标记, 以及具体的杂交操作参照地高辛 DNA 标记和检测试剂盒说明书进行。

1.2.4 莱茵衣藻转化子 RT-PCR 及 RT-PCR Southern blot 分析

采用 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 提取处于对数生长后期的衣藻转化子及野生型衣藻总 RNA; 用 RNase-free DNase I 消化去除基因组 DNA 的污染。通过分光光度计进行 RNA 定量。取 1 μg RNA 作模板, 用反转录酶 MMLV RNase H-进行反转录合成 cDNA 第一链, 然后以 cDNA 第一链为模板, 以引物 bkt1/bkt2 进行 PCR 扩增。PCR 产物, 电泳, 转膜, Southern 杂交。

2 结果与分析

2.1 莱茵衣藻叶绿体转化

通过 RT-PCR 扩增得到 *bkt* 基因, 将 *bkt* 基因插入 p64D, 构建成衣藻叶绿体表达载体 p64Dbkt。通过基因枪法, 在轰击压力为 1 100 Pa 和轰击距离 6 cm 条件下, 将表达载体 p64Dbkt 转入衣藻细胞。表达载

体上含有 *aadA* 选择标记基因, 编码氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶, 赋予转化子具有壮观霉素抗性^[18]。通过 100 mg/L 壮观霉素筛选基因枪轰击后的细胞, 经过 2 个星期左右的培养, 轰击质粒 p64Dbkt 的样品在筛选平板上有墨绿色的藻落长出, 而轰击空金粉的样品在筛选平板上全部死亡, 获得抗性的衣藻转化子。

2.2 PCR 鉴定转化子

经过三轮的固体/液体筛选, 随机挑取 3 个抗性藻落。提取 DNA, 以 *bkt* 和 *aadA* 两对引物进行 PCR 扩增。结果表明转化子内含有这两个外源基因。进一步采用 *chlL1* (P1) 和 *bkt2* (P2) 这两条引物, PCR 扩增确定外源基因定点整合到衣藻叶绿体基因组。PCR 结果显示以 3 个转化子基因组总 DNA 为模板的样品都有一条预期的 1.7 kb 条带出现, 而以野生型衣藻总 DNA 为模板则没有条带出现 (图 1)。结果表明 *bkt* 表达盒定点整合到衣藻的叶绿体基因组中, 通过基因枪法成功地进行了衣藻叶绿体转化。

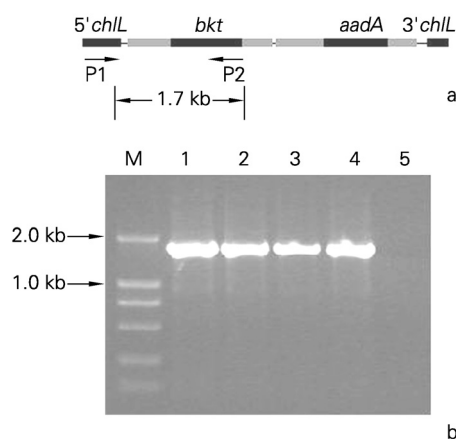


图 1 莱茵衣藻叶绿体转化示意图和转化子的 PCR 分析

Fig. 1 Schematic diagram of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast transformation and the PCR assays of *C. reinhardtii* transformants

a. 衣藻转化子 *chlL* 基因被外源基因中断; b. 以衣藻总 DNA 为模板的 PCR 产物电泳分析

a. *Chlamydomonas reinhardtii* transformants containing the foreign gene and the disrupted *chlL* gene; b. Electrophoretic analysis of PCR products from the template DNA of the wild type and *C. reinhardtii* transformants

M. Marker DL2000 (Takara); 1. 阳性对照 (以质粒 p64Dbkt 为模板); 2~4.

转化子 1~3 的 PCR 产物; 5. 阴性对照 (以野生型衣藻总 DNA 为模板)

M. Marker DL2000 (Takara); 1. positive control (PCR products from plasmid p64Dbkt); 2~4. the PCR products from *C. reinhardtii* transformant lines 1~3;

5. negative control (PCR products from wild-type of *C. reinhardtii*)

2.3 基因组酶切 Southern blot 分析

提取衣藻转化子和野生型衣藻的总 DNA, 用 *EcoR V* 和 *Sac I* 双酶切, 酶切后的基因组电泳, 转膜, 以地高辛标记的完整的 *bkt* 基因为探针, 进行 Southern 杂交分析, 进一步鉴定外源基因 *bkt* 整合基因组情况。结果显示一条 3.9 kb 左右的条带出现在转化子基因 DNA 中 (图 2), 而野生型基因组 DNA 中没有条带出现, 表明 *bkt* 表达盒和 *aadA* 表达盒一起定点整合到衣藻叶绿体基因组中。

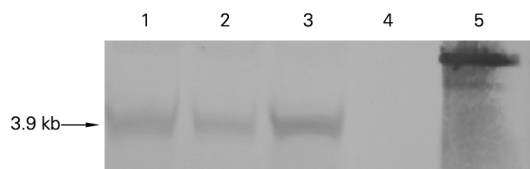


图 2 莱茵衣藻转化子基因组 Southern 杂交分析

Fig. 2 Southern blot analysis of genomic DNA from *C. reinhardtii* transformants

1~3. 衣藻转化子 1~3 的 DNA 杂交; 4. 野生型衣藻 DNA 杂交; 5. 阳性对照 (中间载体 pSKaadAbkt 含有 *bkt* 表达盒和 *aadA* 表达盒)

1~3. the hybridization of DNA of the *C. reinhardtii* transformant lines 1~3;

4. the hybridization of DNA of wild type cells; 5. positive control (the hybridization of plasmid pSKaadAbkt containing *bkt* cassette and *aadA* cassette)

2.4 衣藻转化子 RT-PCR 及杂交分析

atpA 启动子是来源于衣藻的强内源型启动子, 为了进一步分析 *bkt* 在 *atpA* 启动子驱动下, 是否具有转录活性。提取总 RNA, 并且通过 RNase-free DNase I 处理消化基因组 DNA 污染, 通过 MMLV RNase H 反转录酶合成 cDNA 第一条链, 然后以 *bkt1/bkt2* 引物, 进行 PCR 扩增, 结果见图 3a, 以转化子总 RNA 为模板 RT-PCR 的产物就出现了一条 1.0 kb 左右的条带, 而以野生型总 RNA 为模板 RT-PCR 的产物就没有出现任何条带。

同时, 为了排除是衣藻转化子基因组 DNA 污染,

以转化子 RNA 为模板直接 PCR 扩增作为对照, 结果没有扩出任何条带, 表明不是基因组 DNA 污染。为了排除非特异性扩增, 将 PCR 产物以 *bkt* 探针进行杂

交, 杂交结果见图 3b, 在相应的位置也出现了条带。结果表明整合入叶绿体基因组内的 *bkt* 基因具有转录活性, 能够在衣藻中表达。

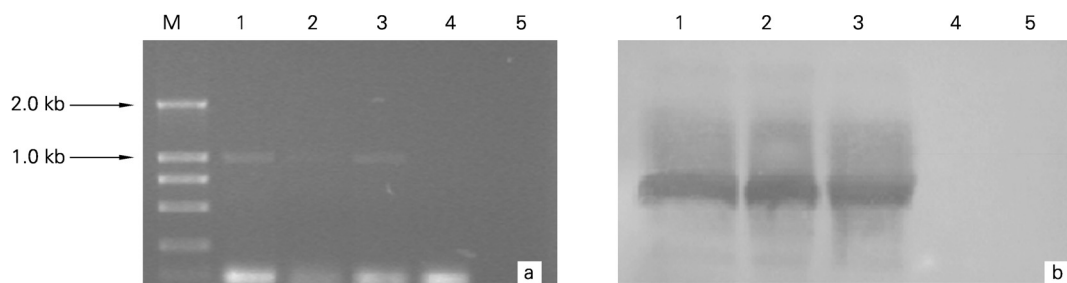


图3 莱茵衣藻转化子 RT-PCR 和 RT-PCR Southern 杂交分析

Fig.3 RT-PCR and RT-PCR Southern blot analyses of *C. reinhardtii* transformants

a. RT-PCR 分析; b. RT-PCR Southern 杂交分析

a. PCR analysis of transformants; b. RT-PCR Southern blot analysis of transformants

M. Marker DL2000 (Takara); 1~3. 衣藻转化子总 RNA RT-PCR 产物; 4. 阴性对照 (野生型衣藻总 RNA RT-PCR 产物);

5. PCR 对照 (以转化子总 RNA 为模板 PCR 产物)

M. Marker DL2000 (Takara); 1~3. the RT-PCR products from *C. reinhardtii* transformant lines 1~3; 4. negative control (the RT-PCR products from wild-type of *C. reinhardtii*); 5. PCR control (the PCR template is the total RNA of transformants)

3 讨论

莱茵衣藻是单细胞绿藻, 素有“光合酵母”之称, 生长速率快、生殖周期短, 是细胞和分子生物学研究领域模式生物之一。自 1982 年 Rochaix 和 Van Dillewijn^[19] 首次报道成功转化莱茵衣藻以来, 衣藻基因工程逐渐成为研究热点。初期常采用 CaMV35S、SV40、NOS 启动子等植物基因工程常用的调控序列^[20,21], 近年来, 逐渐转向内源性启动子, 如 *atpA*、*RBCS2* 基因的上游调控序列。Ishikura 等^[22]将 *Uida* 基因 (编码 β -半乳糖苷酶、GUS) 分别与 *RbcL*、*psbA*、*atpA* 基因的 5'上游调控序列, 构建表达载体, 转化子均能检测到 GUS 活性, 其中 *atpA* 的 5'上游调控序列启动的活性最强。因此本实验采用了 *atpA* 启动子调控外源基因表达。

虾青素合成的底物 β -胡萝卜素在衣藻的叶绿体内, 因此外源基因表达的酶必须在叶绿体内才能与底物作用。目前常用的方法有两种, 一种方法是将外源基因前端加上一个叶绿体导肽, 进行核基因组转化; 另一种方法直接将外源基因定点整合到叶绿体基因

组中, 进行叶绿体转化。叶绿体转化具有两个优点, 一是外源基因在叶绿体中以多拷贝的形式存在, 基因表达通常比细胞核转化的表达量高出几十倍, 甚至几百倍^[23,24], 二是外源基因通过同源重组定点整合到叶绿体基因组中, 避免随机整合所造成的不利影响。因此本实验采用的是叶绿体转化的策略, 将克隆出的雨生红球藻 β -胡萝卜素酮化酶基因 (*bkt*), 构建入衣藻叶绿体表达载体, 通过基因枪转化将 *bkt* 定点整合到叶绿体基因组中, RT-PCR 及 Southern 杂交分析表明 *bkt* 在衣藻内能够转录。

目前, 国内外衣藻叶绿体转化的研究, 主要是建立转化体系、或将外源基因转入衣藻叶绿体内进行药用蛋白的表达^[25~27], 本研究首次尝试了在衣藻中表达类胡萝卜素合成途径的酶, 以期改变类胡萝卜素代谢途径, 在衣藻细胞中积累虾青素。在本研究中 *bkt* 基因在 *atpA* 启动子的调控下, 在衣藻内得到了转录, 转化子内氧化型的类胡萝卜素是否提高, 需要进一步检测, 另外, 作者正在把虾青素合成的另外一个关键

酶 β -胡萝卜素羟化酶基因转入衣藻叶绿体内, 为最终实现在衣藻中合成虾青素进行研究。

参考文献:

- [1] Miki W. Biological functions and activities of animal Carotenoids [J]. **Pure Appl Chem**, 1991, 63: 14-146.
- [2] Palozza P, Krinsky N L. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model [J]. **Arch Biochem Biophys**, 1992, **297**(2): 291-295.
- [3] Fukuzawa K, Inokami Y, Tokumura A, *et al.* Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and α -tocopherol in liposomes [J]. **Lipids**, 1998, 3: 751-756.
- [4] Jyonouchi H, Sun S, Mizokami M, *et al.* Effects of various carotenoids on cloned, effector- stage T-helper cell activity [J]. **Nutr Cancer**, 1996, **26**(3): 313-324.
- [5] Tanaka T, Morishita Y, Suzui M, *et al.* Chemoprevention of mouse urinary bladder by the naturally occurring carotenoid astaxanthin [J]. **Carcinogenesis**, 1994, **15**(1): 15-19.
- [6] Nakano T, Tosa M, Yakeuchi M. Improvement of biochemical features in fish health by red yeast and synthetic astaxanthin [J]. **J Agri Food Chem**, 1995, **43**(6): 1 570-1 573.
- [7] Torrisen O J, Christiansen R. Requirements for carotenoids in fish diets [J]. **J Appl Ichthyol**, 1995, 11: 225-230.
- [8] Bjerkeng B, Johnson G. Frozen storage quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as affected by oxygen, illumination and fillet pigment [J]. **J Food Sci**, 1995, **60**(2): 284-293.
- [9] Misawa N, Satomi Y, Kondo K, *et al.* Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level [J]. **J Bacteriol**, 1995, 177: 6 575-6 584.
- [10] Miura Y, Kondo K, Saito T, *et al.* Production of the carotenoids lycopene, β -carotene and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis* [J]. **App Environ Microbiol**, 1998, 64: 1 226-1 229.
- [11] Mann V, Harker M, Pecker I, *et al.* Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers [J]. **Nat Biotechnol**, 2000, 18: 888-892.
- [12] Kajiwarra S, Kakizono T, Saito T, *et al.* Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis in *Escherichia coli* [J]. **Plant Mol Biol**, 1995, 29: 343-352.
- [13] Linden H. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1999, 1446: 203-212.
- [14] Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn A. Culture of the astaxanthin- producing green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. **J Appl Phycol**, 1991, 3: 295-304.
- [15] Harris E. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use [M]. San Diego: Academic Press, 1989. 31-52.
- [16] Kindle K L, Richards K L, Stem D B. Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1991, 88:1 721-1 725.
- [17] Wang C G, Hu Z, Hu W, *et al.* Expression and molecular analysis of *phbB* gene in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Chin Sci Bull**, 2004, 49: 1 713-1 717.
- [18] Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas* [J]. **Nucleic Acids Res**, 1991, 19: 4 083-4 089.
- [19] Rochaix J D, Van Dillewijn J. Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA [J]. **Nature**, 1982, 296: 70-72.
- [20] Hall L M, Taglor K B, Jones D D. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Gene**, 1993, 124: 75-81.
- [21] Day A, Debuchy R, Dillewijn J V, *et al.* Studies on the maintenance and expression of cloned DNA fragments in the nuclear genome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Physiol Plant**, 1990, 78: 254-260.
- [22] Ishikura K, Takaoka Y, Kato K, *et al.* Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast [J]. **J Biosci Bioeng**, 1999, 87: 307-314.
- [23] Kota M, Daniell H, Varma S, *et al.* Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1999, 96:

- 1 840-1 845.
- [24] Staub J M, Garcia B, Graves J, *et al.* High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts [J]. **Nat Biotechnol**, 2000, 18: 333-338.
- [25] 范国昌, 苏宁, 张中林, 等. 衣藻叶绿体表达体系的建立 [J]. 科学通报, 1999, 44: 1 301-1 306.
- [26] Sun M, Qian K X, Su N, *et al.* Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast [J]. **Biotechnol Lett**, 2003, 25: 1 087-1 092.
- [27] Su Z L, Qian K X, Tan C P, *et al.* Recombination and heterogeneous expression of allophycocyanin gene in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Acta Biochim Biophys Sin**, 2005, 37(10): 709-712.

Expression of β -carotene ketolase gene from the green alga *Haematococcus pluvialis* in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast

TAN Cong-ping^{1,2}, YAN Bin-lun³, LIANG Cheng-wei^{1,2}, SU Zhong-liang⁴, QIN Song¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Huai Hai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 4. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Received: May, 6, 2006

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; chloroplast transformation; β -carotene ketolase gene (*bkt*)

Abstract: β -carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis* is one of the key enzymes of the astaxanthin biosynthesis. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast expression vector p64Dbkt contained β -carotene ketolase gene (*bkt*) under the *atpA* promoter and *rbcL* terminator. The vector p64Dbkt was transferred to the chloroplast genome of *C. reinhardtii* using a micro-particle bombardment. The transgenic alga was selected and maintained in the TAP agar plates containing 100 mg/L spectinomycin. PCR and Southern blot analyses indicated that *bkt* was integrated into the chloroplast genome of the transformants. RT-PCR and RT-PCR Southern assays showed that *bkt* gene was expressed in *C. reinhardtii* transformants.

(本文编辑: 张培新)